

***In vitro*-Stimulierbarkeit der Akkumulation von PAH  
in gesundem Nierengewebe von Ratte und Mensch und  
in menschlichem Nierenzellkarzinomgewebe**

**Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Birgit Bachner  
geboren am 09.06.1971 in Köthen  
und  
von Ute Strohm  
geboren am 15.12.1971 in Karl-Marx-Stadt

## **Gutachter**

- 1. Prof. Dr. Fleck**
- 2. Prof. Dr. Schubert**
- 3. Prof. Dr. Burghardt**

**Tag der öffentlichen Verteidigung:**

**05. März 2002**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>3</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>5</b>
1.1 Physiologische Grundlagen der Harnbereitung .....	5
1.2 Transportmechanismen im proximalen Tubulus .....	6
1.3 Nierentumoren .....	9
1.3.1 Einteilung der epithelialen Nierentumoren .....	10
1.3.2 Mechanismus der renalen Karzinogenese .....	12
1.3.3 Multidrug resistance (MDR) .....	14
1.4 Therapieansätze: Von <i>in vitro</i> -Untersuchungen bis zur klinischen Anwendung .....	17
1.5 Versuchsgrundlagen und Zielstellung .....	21
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>26</b>
2.1 Untersuchungsmaterial.....	26
2.1.1 Tierversuche .....	26
2.1.2 Versuche an menschlichem Nierenzellkarzinomgewebe.....	26
2.2 Versuchsdurchführung .....	32
2.2.1 Tierversuche .....	32
2.2.2 Versuche an menschlichem Nierenzellkarzinomgewebe.....	33
2.2.2.1 Akutversuche .....	35
2.2.2.2 Langzeitversuche .....	36
2.3 <i>In vitro</i> -Stimulation der PAH-Akkumulation in Nierenzellkarzinomgewebe ....	37
2.4 Probenaufarbeitung .....	38
2.4.1 Homogenat .....	38
2.4.2 Medium (Filtrat).....	39
2.5 Eichkurve .....	39
2.6 Bestimmungsmethoden.....	40
2.6.1 Messung der PAH-Konzentration.....	40
2.6.2 Glutathionbestimmung.....	42
2.6.2.1 GSH.....	42
2.6.2.2 GSSG .....	42
2.6.3 Kaliumbestimmung .....	43
2.7 Statistische Bearbeitung und Auswertung der Ergebnisse.....	43
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
3.1 PAH-Akkumulation in intaktem Nierengewebe der Ratte .....	44

3.1.1	Abhängigkeit der PAH-Akkumulation von der Inkubationszeit.....	44
3.1.2	Einfluss von Dexamethason und Triiodthyronin auf die PAH-Akkumulation.....	46
3.1.3	Abhängigkeit der Stimulation der PAH-Akkumulation von der Energiebereitstellung.....	48
3.1.4	Bestimmung der Konzentration von $K^+$ , GSH und GSSG zur Charakterisierung der Funktionsfähigkeit der Zelle.....	50
3.2	PAH-Akkumulation in intaktem Nierengewebe und Nierenzellkarzinomgewebe des Menschen.....	55
3.2.1	Akutversuche – 2-stündige Inkubation von menschlichem Nierenzellkarzinomgewebe in PAH-haltigem Cross-Taggart-Medium..	55
3.2.2	PAH-Akkumulation in Nierenzellkarzinomgewebe des Menschen nach 24-stündiger Inkubation .....	57
3.2.3	Einfluss von Dexamethason und Triiodthyronin ( $T_3$ ) auf die PAH-Akkumulation in Nierenzellkarzinomgewebe des Menschen.....	59
3.2.4	Abhängigkeit der Stimulation der PAH-Akkumulation von der Energiebereitstellung.....	64
3.2.5	Bestimmung der Konzentration von $K^+$ , GSH und GSSG zur Charakterisierung der Funktionsfähigkeit der Zellen des intakten Nierengewebes und des Nierenzellkarzinomgewebes vom Menschen...	66
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>68</b>
4.1	PAH als Modellsubstanz für die renale tubuläre Sekretion .....	69
4.2	PAH-Akkumulation in Nierengewebe der Ratten und deren <i>in vitro</i> -Stimulierbarkeit.....	70
4.3	PAH-Akkumulation in menschlichem Nierenzellkarzinomgewebe.....	73
4.4	Beeinflussung der PAH-Akkumulation in menschlichem Nierenzellkarzinomgewebe durch Dexamethason und Triiodthyronin .....	77
4.5	Ausblick: Welche therapierelevanten Ansätze könnten sich aus den vorliegenden Untersuchungen ergeben? .....	80
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>86</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>89</b>
	<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>111</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>112</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>113</b>

# Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
CA	Karzinom
cMOAT	canalicular Multispecific Organic Anion Transporter = MRP2
CT	Computertomographie
CTM	Cross-Taggart-Medium
Dexa	Dexamethason
EGF	Epidermal growth factor; epidermaler Wachstumsfaktor
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
K	Kontrollgruppe
kD	Kilo-Dalton, atomare Masseneinheit
MBW	Mediumbezugswert
MDR	Multidrug resistance
mdr1	MDR1-Gen
mdr2	MDR2-Gen
MRK16	Monoklonale Antikörper
MRP1	Multidrug Resistance-associated Protein1
MRP2	Multidrug Resistance-associated Protein2 = cMOAT
mrp1	MRP1-Gen
MRT	Magnetresonanztomographie
Mw	Mittelwert
NRS	Nierenrindenschnitt
NZK	Nierenzellkarzinom
OAT	organischer Anionentransporter
OCT	organischer Kationentransporter
OPA	o-Phthaldialdehyd
PAH	p-Aminohippursäure
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Pseudomonas-Exotoxin
Pgp	P-Glykoprotein

PGT	Prostaglandin-Transporter
PKC	Proteinkinase C
PVC	Polyvinylchlorid
$Q_{S/M}$	Schnitt-Medium-Quotient
SAT	Sulfat-Anionentransporter
$S_x$	Standardfehler
$T_3$	Triiodthyronin
TIL	Tumordinfiltrierende Lymphozyten
$T_m$	maximale tubuläre Transportleistung
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
UAT	Urat-Anionentransporter
US	Ultraschall
WEM	Williams E-Medium
WFR	Wiederfindungsrate

# 1 Einleitung

## 1.1 Physiologische Grundlagen der Harnbereitung

Die menschliche Niere enthält ca. 1,2 Millionen Nephrone. Sie bestehen aus dem Glomerulus, in dem der Primärharn gebildet wird, und dem Tubulusapparat, in dem intensive Rückresorptions- und Sekretionsvorgänge stattfinden (THEWS et al., 1999). Die Gesamtdurchblutung beider Nieren beträgt beim gesunden Erwachsenen ca. 1700 l/Tag, das sind etwa 25% des Herzzeitvolumens. 150 l bis 200 l davon werden aus dem Kapillarlumen als Primärharn ausgeschieden. Im Blut enthaltene Stoffe mit einem Molekulargewicht bis 5000 Dalton werden uneingeschränkt in den Primärharn filtriert. Direkt an das Glomerulum schließt sich der proximale Tubulus an. Er beginnt mit der stark gewundenen Pars convoluta, die in die gestreckt verlaufende Pars recta übergeht. An den proximalen Tubulus, der von einem kubischen Epithel mit einem Bürstensaum ausgekleidet ist, schließt sich das gebogene, haarnadelförmige Überleitungsstück, bestehend aus Plattenepithelzellen, an. Zusammen mit der aufsteigenden Pars recta des distalen Tubulus bildet es die Henle'sche Schleife. Der letzte Abschnitt, die Pars convoluta des distalen Tubulus mündet in das Sammelrohr, welches schließlich in die Nierenkelche übergeht. Auf einem sagittalen Schnitt durch die Niere erkennt man eine Gliederung in zwei Schichten: die äußere, hellere Rindenschicht (Cortex) enthält die Nierenkörperchen und die gewundenen Anteile des proximalen und distalen Tubulus, während die innere, dunkle Markschiicht (Medulla) die Henle'schen Schleifen und die Sammelrohre enthält (KRIZ und KAISLING, 1992).

Vom Primärharn, dessen Menge der glomerulären Filtrationsrate (GFR) entspricht, werden im tubulären System mehr als 99% des Flüssigkeitsvolumens sowie der größte Teil der gelösten Bestandteile rückresorbiert und dem Blutkreislauf wieder zugeführt. Im proximalen Tubulus werden ca. 60% des Wassers reabsorbiert, in dem auch Natrium-, Kalzium-, Chlorid- und Hydrogencarbonationen sowie Glukose, Urat und Aminosäuren zu einem hohen Prozentsatz in das Blut zurückgeführt werden. Dazu besitzen die proximalen Tubuluszellen eine Vielzahl von aktiven und passiven Transportsystemen, sowohl an der luminalen als auch auf der basolateralen Zellmembran. Zusätzlich zu der Rückresorption erfolgt eine Sekretion vom peritubulären Blutkreislauf in das

Tubuluslumen hinein. Neben Protonen und Ammoniak werden hauptsächlich körpereigene und körperfremde organische Säuren (z.B. Harnsäure, p-Aminohippursäure (PAH), Penicillin, Diuretika, nichtsteroidale Antirheumatika) und organische Basen (z.B. Morphin und Tetraethylammonium) auf diese Weise in den Endharn sezerniert (Mc KINNEY, 1982).

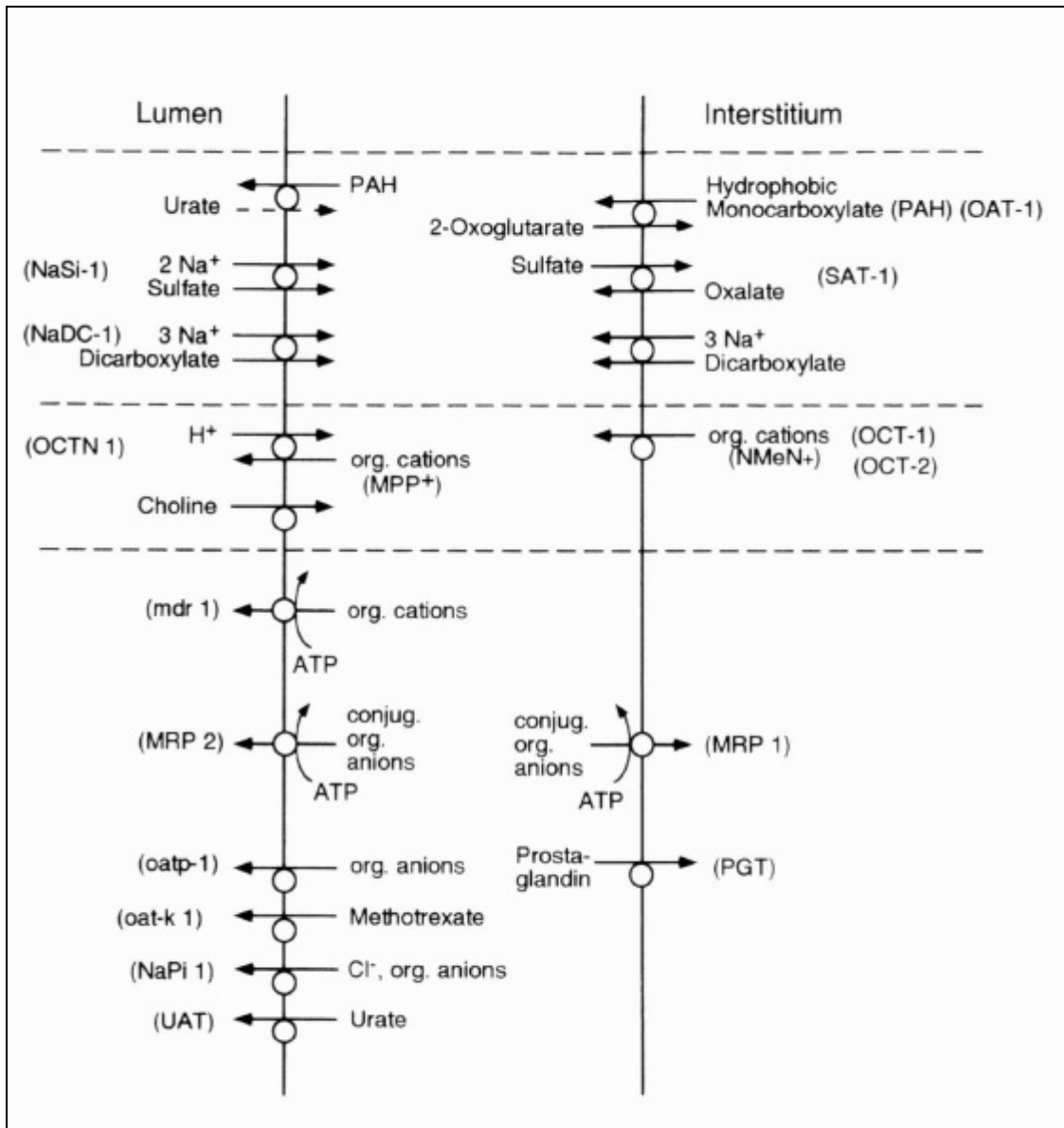
In die Henle'sche Schleife gelangen 40% des Primärharns; 20% werden hier zusammen mit Natrium-, Kalium-, Kalzium-, Magnesium- und Chloridionen rückresorbiert. Im distalen Tubulus und in den Sammelrohren wird schließlich in Abhängigkeit vom aktuellen Flüssigkeitshaushalt des Organismus das Volumen des Endharns (1 bis 2 l/Tag) sowie die Menge der auszuscheidenden Ionen feinreguliert (GIEBISCH et al., 1996).

## 1.2 Transportmechanismen im proximalen Tubulus

Die Niere ist somit als wichtigstes Exkretionsorgan in der Lage, durch Filtration und aktive Transportmechanismen körpereigene Stoffwechselendprodukte, Arzneimittel und Fremdstoffe auszuscheiden (VAN GINNEKEN und RUSSEL, 1989). Dabei kann die tubuläre Sekretionsleistung im Einzelfall die Filtration um ein Vielfaches übersteigen. Der Fremdstofftransport ist unspezifisch, wobei aber vielfältige Carriermechanismen für schwache organische Säuren (z.B. PAH) sowie für organische Basen existieren (BERNDT, 1989; BESSEGHIR und ROCH-RAMEL, 1987; GLOFF et al., 1988; PRITCHARD und MILLER, 1993; ULLRICH et al., 1992).

Durch Carrier gelangen Fremdstoffe über die basolaterale Tubulusmembran ins Zellinnere. Der aus dem Interstitium in die Tubuluszelle gerichtete aktive Transport induziert einen Konzentrationsgradienten zwischen Zelle und Tubuluslumen. Die Ausscheidung des Fremdstoffes aus der Tubuluszelle in den Endharn erfolgt größtenteils passiv. Allerdings wurden auch aktive Transporte an der luminalen Membran der Tubuluszelle für den Austransport gefunden. In der **Abbildung 1** sind die verschiedenen Transporter der basolateralen und luminalen Seite der proximalen Tubuluszelle dargestellt. Für den Transport organischer Anionen sind der basolaterale PAH/ $\alpha$ -Ketoglutarat Austauscher und der luminale Urat/PAH Austauscher, der luminale  $\text{Na}^+$ /Sulfat Cotransporter und der basolaterale Sulfat/Oxalat Austauscher, sowie auf beiden Seiten der  $\text{Na}^+$ /Dicarboxylat Cotransporter von besonderer Bedeutung. Die organischen Kationen werden vorrangig durch den basolateralen  $\text{NMeN}^+$  Transporter und auf der luminalen Seite den  $\text{H}^+$ /MPP $^+$  Austauscher und den Cholin $^+$  Transporter ausgeschieden.





**Abbildung 1**

Organische Anionen- und Kationentransporter an der luminalen und kontraluminalen Seite des proximalen Tubulus (ULLRICH, 1998). Der Methotrexat-Transporter oat-k1 wurde ursprünglich der kontraluminalen Zellseite (SAITO et al., 1996) und der OCT-2 Transporter der luminalen Zellseite zugeordnet (GRÜNDEMANN et al., 1997).

Die folgenden Transporter konnten bisher noch nicht unter *in situ*-Bedingungen bezüglich ihrer Substratspezifität getestet werden, sie sind jedoch Gegenstand der vorliegenden Dissertation und müssen im Zusammenhang mit der **Abbildung 1** erwähnt werden. Auf der luminalen Seite der proximalen Zelle befinden sich: das ATP-abhängige mdr1 (OUDE ELFERINK et al., 1998) und MRP-2 (KEPPLER et al., 1998a; SCHAUB et al., 1997), des weiteren der multispezifische Anionentransporter oatp 1 (BERGWERK et al., 1996; HAGENBUCH et al., 1998), der Methotrexat-Transporter oat-k1 (MASUDA

et al., 1997), der mutmaßliche Anionentransporter NaPi-1 (LANG et al., 1998) und der Urat-Transporter UAT (LEAL-PINTO et al., 1997). Alle diese luminalen Transporter können eine Rolle spielen beim organischen Anionen- und Kationentransport aus der Zelle in das Tubuluslumen. Auf der basolateralen Zellseite des proximalen Tubulus wurden MRP-1 (EVERS et al., 1996; KEPPLER et al., 1998b) und der Prostaglandintransporter PGT (KANAI et al., 1995) gefunden.

Die Sekretion organischer Anionen erfolgt hauptsächlich über den PAH/ $\alpha$ -Ketoglutarat Austauscher (ULLRICH, 1998), dessen Mechanismus von BURCKHARDT et al. (1998) und PRITCHARD (1988) untersucht wurde, sowie über den Urat/PAH Austauscher, der von KAHN und ARONSON (1983), ROCH-RAMEL et al. (1994, 1996, 1997) und WEINMAN et al. (1983) charakterisiert wurde.

Der Fremdstofftransport ist energieabhängig. Dabei kann zwischen primär aktivem Transport, bei dem die Energie durch Hydrolyse von ATP entsteht, und sekundär aktivem Transport unterschieden werden, wobei die Fremdstoffe einem aktiven Elektolyttransport, meist dem des Natriums, folgen (PRITCHARD und MILLER, 1993). Die Energiebereitstellung lässt sich bei *in vitro*-Versuchen u.a. durch Stickstoffbegasung blockieren (STOPP und BRÄUNLICH, 1975). Die maximale Transportkapazität ist limitiert (KAHN et al., 1985), somit kann für jede Substanz ein  $T_m$ -Wert ermittelt werden. Die genannten aktiven Transportprozesse sind von pharmakologischem Interesse, weil sie die Verweildauer vieler Arzneimittel im Biosystem bestimmen (BESSEGHIR und ROCH-RAMEL, 1987; KINNE, 1991). Praktisch wichtig ist auch, dass die Kapazität dieser Transportsysteme beeinflusst werden kann: es kann sowohl zu einer kompetitiven Hemmung des Transportes als auch zu einer Stimulation der Transportkapazität durch eine Vorbehandlung mit verschiedenen Pharmaka kommen (BRÄUNLICH, 1987).

Tubuläre Transporte lassen sich auch *in vitro* nachweisen. Durch den aktiven, energieabhängigen Eintransport von Fremdstoffen in die Tubuluszelle kommt es *in vitro* in Nierenrindenschnitten zur Anreicherung der Stoffe gegenüber dem umgebenden Medium. Diese Akkumulation ist Ausdruck des aktiven tubulären Transportes und kann zur Charakterisierung von Fremdstofftransporten in der Niere genutzt werden, da man nachweisen konnte, dass im Nierenrindenschnitt die Tubuluslumina kollabieren und somit ein Austransport der akkumulierten Substanzen in das Lumen nicht möglich ist (KINNE, 1991).

Die in der Literatur beschriebenen Befunde sind bisher u.a. an gesundem Nierengewebe von Versuchstieren (Ratte, Kaninchen, Maus) erhoben worden (BRÄUNLICH, 1981). Es gibt nur wenige Angaben im Schrifttum über den Fremdstofftransport im menschlichen Nierengewebe (FLECK et al., 1998). Unseres Wissens wurde die Fremdstoffaufnahme in Zellen des menschlichen Nierenzellkarzinoms (NZK) bisher noch nicht untersucht. Wir wandten uns daher der Frage zu, ob menschliches Nierengewebe bzw. Nierenzellkarzinomgewebe *in vitro* Fremdstoffe akkumulieren kann bzw. ob dieser Prozess beeinflussbar ist. Es sollten damit erste Ansätze aufgezeigt werden, um die Chemoresistenz des NZK zu überwinden.

### 1.3 Nierentumoren

Der Anteil der Nierentumoren an der Anzahl von Malignomen bei Erwachsenen beträgt ungefähr 3%; im Vergleich zu Frauen sind Männer doppelt so häufig betroffen. Der Häufigkeitsgipfel liegt jenseits des 50. Lebensjahres und die Inzidenz der Nierentumoren hat in den letzten 60 Jahren stetig zugenommen. Mit einem Anteil von mehr als 80% ist das tubuläre Adenokarzinom (Nierenzellkarzinom) der häufigste Nierentumor (MOTZER et al., 1996; STÖRKEL et al., 1997).

Obwohl in Langzeitstudien am Tier mehr als 100 Stoffe Nierentumoren hervorrufen können (LIPSKY und TRUMP, 1988), gibt es für den Menschen kaum epidemiologische Daten über nephrokanzerogene Stoffe. Die häufig sehr lange Latenzzeit zwischen Exposition, Tumorentstehung und Tumordiagnostik erschweren die epidemiologische Untersuchung beträchtlich.

Lokal begrenzte und nichtmetastasierte Nierenzellkarzinome haben eine exzellente Prognose mit 5-Jahres-Überlebensraten von über 90%. Zum Zeitpunkt der Diagnose weisen jedoch über 30% der Patienten bereits Lymphknoten- oder Organmetastasen auf und bei ca. 25% der Betroffenen liegt bereits ein lokal fortgeschrittener Tumor mit Organüberschreitung vor. Die Behandlungsmöglichkeiten metastasierter NZK sind äußerst beschränkt, ein Therapieschema mit kurativer Zielstellung existiert derzeit nicht (PORZOLT et al., 1996).

Charakteristisch für das NZK ist sein schlechtes Ansprechen auf eine Therapie mit Zytostatika. Diesem als multidrug resistance (MDR) bezeichneten Phänomen können verschiedene Ursachen zugrunde liegen:

- ein beschleunigter Abbau der Zytostatika in der Tumorzelle

- eine verminderte Aufnahme der Zytostatika in die Tumorzelle
- ein verstärkter Austransport der Zytostatika aus der Tumorzelle.

Vielfältige Untersuchungen sprechen dafür, dass gerade beim NZK dem vermehrten Austransport der Zytostatika eine bedeutende Rolle zukommt. Es konnte belegt werden, dass in den Zellen des NZK vermehrt das MDR-Transportprotein exprimiert wird, das zu einem schnellen Entfernen des Zytostatikums aus der Tumorzelle beiträgt (CHAPMAN und GOLDSTEIN, 1995; LICHT et al., 1995; MICKISCH, 1994a,1994b; MICKISCH et al., 1991a; NAITO et al., 1993; NISHIYAMA et al., 1993; VOLM et al., 1991). Auf das durch das MDR1 Gen exprimierte Transportprotein P-Glykoprotein wird im Abschnitt 1.3.3. näher eingegangen. Im Nierenrindengewebe befindet sich der höchste Gehalt an MDR1-mRNA in den Zellen des proximalen Tubulusabschnittes, wo auch gehäuft Nierenzellkarzinome entstehen.

Aufgrund der außerordentlichen Chemoresistenz ist die Behandlung des NZK mit Zytostatika stark limitiert bzw. Gegenstand vieler Untersuchungen (s. 1.4). Eine Bestrahlungstherapie kommt beim NZK nicht in Frage, da das umgebende Gewebe mit geschädigt werden würde. Die Therapie der Wahl ist zum jetzigen Zeitpunkt die operative Entfernung des Tumors. Die Behandlung geht von organschonender Tumorteilresektion bis hin zur radikalen Nephrektomie (MICKISCH, 1994c; MICKISCH und SCHRÖDER, 1996).

### 1.3.1 Einteilung der epithelialen Nierentumoren

In den letzten Jahren wurden verschiedene morphologische Subtypen von Nierentumoren charakterisiert. Daraus resultierten unterschiedliche Klassifikationen des NZK, die als Grundlage entweder zytologische Kriterien (klarzellig versus chromophil versus chromophob) (THOENES et al., 1986), oder histologische Kriterien (papillär versus nicht papillär) (MOSTOFI, 1981) verwendeten. THOENES et al. (1986) empfahlen eine Klassifikation (**Tabelle 1**) nach histomorphologischen und histochemischen Kriterien. Basierend auf immunhistochemischen und zytogenetischen Verfahren konnten 5 eigenständige Subtypen etabliert werden (BUGERT und KOVACS, 1996; KOVACS, 1993). Als häufigster Subtyp dieser Klassifikation findet sich das klarzellige Nierenzellkarzinom mit dem typischen pflanzenzellähnlichem Bild. Die klarzelligen Läsionen sind durch die Ausbildung zystischer oder solider Formationen gekennzeichnet und speichern massenhaft Glykogen oder Lipide. Ein Anstieg des Glukose-6-phosphatspiegels

konnte in diesen Tumoren festgestellt werden. Tierexperimentelle Untersuchungen legen nahe, dass diese Tumore bei der Ratte aus Zellen des Sammelrohrsystems hervorgehen (BANNASCH et al., 1989).

**Tabelle 1:** Subtypisierung, Histogenese und bevorzugtes Wachstumsmuster von Nierentumoren und ihre Häufigkeit nach Literaturangaben (SCHRÖDER, 1995; THOENES et al., 1990)

<b>Subtyp</b>	<b>Ursprung</b>	<b>Wachstumsmuster</b>	<b>Häufigkeit</b>
Klarzellige Nierenzellkarzinome	Proximale Tubuluszelle	Solide, zystisch	62-71 %
Chromophile Nierenzellkarzinome	Proximale Tubuluszelle	Tubulopapillär, papillär	15-25 %
Chromophobe Nierenzellkarzinome	Schaltzelltyp B des Verbindungsstücks und Sammelrohres	Solide	3-5 %
Ductus-Bellini-Karzinome	Hauptzelle des Sammelrohres	Variiert inmitten eines entzündlichen desmoplastischen Stromas	< 1 %
Renale Onkozytome	Schaltzelltyp A des Verbindungsstücks und Sammelrohres	Solide	5 %

Der zweithäufigste Subtyp ist das chromophile bzw. tubulopapilläre Nierenzellkarzinom. Beide Subtypen haben ihren Ursprung in den proximalen Tubuluszellen. Diese unterscheiden sich nicht nur lichtmikroskopisch, sondern auch zytogenetisch voneinander. Während beim klarzelligen Subtyp gehäufte Aberrationen des Chromosoms 3p beobachtet werden, finden sich beim chromophilen Subtyp vornehmlich Trisomien des Chromosoms 7 und 17 (GRANATA et al., 1992).

Der dritthäufigste Subtyp ist das von STÖRKEL et al. (1988) und THOENES et al. (1988) beschriebene chromophobe Nierenzellkarzinom. Als histogenetischer Ursprung konnte der Schaltzelltyp B des Verbindungsstücks und des kortikalen Sammelrohrs identifiziert werden.

Sehr viel seltener finden sich NZK, die sich aus den Hauptzellen der medullären Sammelrohre (sog. Bellini-Gänge) entwickeln (RUMPELT et al., 1991).

Als weitere Tumorart ist das renale Onkozytom zu nennen. Aufgrund seines benignen Wachstumsverhaltens sollte es nicht den NZK zugerechnet werden. Enzymhistologische Untersuchungen haben ergeben, dass die Zellen des Nierenonkozytoms eine starke Aktivität oxidativer Enzyme aufweisen, wobei das Enzym Glukose-6-phosphatdehydrogenase in seiner Aktivität deutlich verringert ist. Diese Stoffwechseleigenart könnte erklären, warum die Onkozyten arm an Ribosomen und nur zu einem langsamen Wachstum befähigt sind (MAYER et al., 1989; ORTMANN et al., 1988).

### **1.3.2 Mechanismus der renalen Karzinogenese**

Vielfältige Veränderungen werden während der renalen Karzinogenese beobachtet, so dass eine Vielzahl von ätiologischen Faktoren, die bei Labortieren das Nierenzellkarzinom induzieren, bekannt sind. Dennoch bleibt die Ursache der neoplastischen Zelltransformation noch unklar. Die Änderung von Phäno- und Genotyp in den Nierenzellen muss weiterhin sorgfältig analysiert und in die derzeitige Konzeption der renalen Karzinogenese integriert werden.

1. Verschiedene unspezifische, toxische Effekte sind am Mechanismus der renalen Karzinogenese beteiligt. Eine Hyperplasie verbunden mit der Zellnekrose betrachten viele Autoren als frühes Stadium. Die Hyperplasie als Folge unspezifischer toxischer Läsionen wird vorrangig als mögliche Ursache der neoplastischen Entwicklung in der Niere betrachtet, falls sie keine mutagene Aktivität zeigt (HOLM-NIELSEN und OLSEN, 1988; LIPSKY und TRUMP, 1988; MELNICK et al., 1996; WAALKES, 2000).
2. Es wird angenommen, dass die verschiedenen zellulären Phänotypen der epithelialen Nierentumoren die abnormale Genexpression, verbunden mit neoplastischer Änderung bestimmter Zellklone, reflektiert (HOLM-NIELSEN und OLSEN, 1988; KALLIONIEMI et al., 1994), oder das Ergebnis verschiedener Differenzierungsgrade von einer gemeinsamen Vorläuferstammzelle ist (COHEN et al., 1988). Obwohl eine große Vielfalt neoplastischer Phänotypen auftreten, gibt es ein übereinstimmendes Aussehen gut definierbarer Tumortypen, deren Ursprung auf ein bestimmtes Segment des tubulären Systems zurückzuführen ist (SCHRÖDER, 1995).

Zytologisch unterschiedliche Tumortypen haben auch eine unterschiedliche Zytogenese. Die morphologische und funktionelle Änderungen der normalen Epithelzellen der Niere, scheint eine wichtige Rolle in der Bestimmung des Tumorzelltypes zu

spielen. Irreversible Änderungen im Energiestoffwechsel konnten während der Entwicklung aller Typen von Tumoren nachgewiesen werden. Die Ursache der übermäßigen Einlagerung von Polysacchariden oder Fetten in der präneoplastischen oder neoplastischen Läsion konnte nicht erklärt werden, es muss aber angenommen werden, dass die bisher unklare Akkumulation von Stoffwechselendprodukten eine grundlegende Voraussetzung ist. Verschiedene biochemische und enzymhistochemische Beobachtungen an menschlichen, renalen Adenokarzinomen haben bewiesen, dass die Änderung des Kohlenhydratstoffwechsels in Richtung des Pentose-Phosphat-Weges und der Glykolyse dominiert (BANNASCH et al., 1986; MAYER und BANNASCH, 1988). Studien an basophilen Nierenzelltumoren der Ratte konnten ebenfalls merkbare Änderungen im Energiestoffwechsel nachweisen. Der Übergang von der oxidativen zur glykolytischen Produktion von ATP mit entsprechender Reduktion der mitochondrialen Atmung ist charakteristisch für diesen Tumortyp (BANNASCH et al., 1986). Da die Pentosephosphate unter anderem auch zur RNA- und DNA-Synthese beitragen, ist die Aktivierung dieses Weges wahrscheinlich eng verbunden mit anderen metabolischen Veränderungen, wie den Anstieg der Ribosomenzahl und der vermehrten Zellproliferation in präneoplastischen und neoplastischen Läsionen.

3. Als dritte Ursache kommen chromosomale Aberrationen und molekulargenetische Veränderungen für das Entstehen eines Nierenzellkarzinomes infrage (TORRES et al., 1998). Es existiert eine Diskrepanz zwischen dem detaillierten Wissen der phänotypischen Zelländerungen während der renalen Karzinogenese und den wenigen Informationen über molekulare Veränderungen, die den neoplastischen Umwandlungen initiieren und helfen könnten, die phänotypische Vielfalt der Nierentumoren zu erklären. Molekulargenetische Studien der letzten Jahre an menschlichen Nierenkarzinomen ergaben interessante Veränderungen im Genotyp. Als bedeutendste chromosomale Aberration, ist die Eliminierung des kurzen Armes an einem der zwei homologen Chromosomen 3 bei 70% der Tumoren bekannt. Diese 3p-Deletionen waren auffällig häufig mit einem klarzelligen Tumortyp assoziiert. Im Gegensatz zu dem klarzelligen NZK zeigten papilläre NZK keine 3p-Deletion, jedoch Verluste des Chromosoms Y, sowie Tri- bzw. Tetrasomien der Chromosomen 7 und 17 (BUGERT und KOVACS, 1996; KOVACS, 1993). Mit ihren Ergebnissen kamen sie zu dem Schluss, dass mehr als eine chromosomale Region für die Alteration des Phänotypes des renalen Adenokarzinoms verantwortlich sein muss.

Zytogenetische Untersuchungen an Onkozytomen zeigten sowohl Zellen mit normalen als auch anormalen Zellkernen, aber keiner chromosomalen Veränderung (KOVACS et al., 1989).

Obwohl die zytogenetischen und molekulargenetischen Daten beeindruckend sind, konnten alle bisher beschriebenen Anomalien nur zum Teil in den jeweiligen Tumortypen gefunden werden.

### **1.3.3 Multidrug resistance (MDR)**

Alle Lebewesen, einschließlich des Menschen, waren in der Evolution gezwungen, Abwehrmechanismen gegen die mit der Nahrung oder der Atemluft aufgenommenen Umweltgifte zu exprimieren (MICKISCH, 1993). Ein wichtiges Abwehrsystem des menschlichen Körpers wird durch Expression des MDR1-Genes möglich, welches mit Hilfe des Genproduktes P-Glykoprotein schädliche Stoffe aus der Zelle schleust, bevor eine Schädigung eintritt (BORST, 1991; ENDICOTT und LING, 1989; NOOTER und HERWEIJER, 1991). Es ist bekannt, dass Chemotherapeutika in oraler Form unwirksam sind und parenteral verabreicht werden müssen, da sie durch das P-Glykoprotein der Darmschleimhaut im Darmlumen zurückgehalten werden. Die Expression des menschlichen MDR1-Genes konnte vor allem im tubulären Epithel von Ausscheidungsorganen wie Niere, Darm, Leber und Pankreas, in der Nebennierenrinde und in der Plazenta nachgewiesen werden. Weiter ist das MDR1-Genprodukt P-Glykoprotein in einigen hochspezialisierten Endothelien des Gehirns und des Hodens vorhanden, die wahrscheinlich einen Teil der „Blut-Hirn-Schranke“ oder der Barriere darstellen, die das sensible Hodengewebe schützt (GOTTESMAN et al., 1990). Diese Befunde haben die Auffassung bestätigt, dass die Funktion des MDR1-Genes darin besteht, eine Resistenz gegen Umwelttoxine zu erreichen. Der Mensch besitzt 2 MDR-Gene (MDR1 und MDR2), die zu 80 % homolog sind und auf dem Locus q21.1 des Chromosomes 7 liegen. Nur durch Transfektion des MDR1-Genes können chemosensible Krebszellen in chemoresistente Mutanten verwandelt werden, und nur MDR1 wird in nahezu allen chemoresistenten menschlichen Tumoren in hohen Mengen exprimiert (MICKISCH, 1993). Karzinome, die sich in Ausscheidungsorganen, wie der Niere entwickeln, nutzen die eigentliche Schutzfunktion des MDR1-Genes aus und werden dadurch resistent gegen die Behandlung mit Chemotherapeutika (GOTTESMAN und PASTAN, 1988).



Eine Einteilung erfolgt in primäre („intrinsische“) und sekundäre („erworbene“) Resistenz, wobei die oben aufgelisteten Tumoren zur ersten Gruppe zählen und Tumoren der Brustdrüse oder der Eierstöcke zur zweiten Gruppe zu rechnen sind, da sie initial auf Chemotherapie reagieren, aber ihre Rezidive keiner weiteren Chemotherapie zugänglich sind.

Des weiteren wird in Einfach- und Vielfachresistenz unterschieden. Als Einfachresistenz sei das Beispiel der Methotrexat-Resistenz genannt, klinisch bedeutender ist die Vielfachresistenz, bei der eine breite Kreuzresistenz der Tumorzelle gegen Chemotherapeutika unterschiedlicher Struktur und Wirkungsweise vorliegt. Dieses Phänomen wird **multidrug resistance** (MDR) genannt. Die MDR ist komplex und multifaktoriell (EFFERTH et al., 1993).

Drei biochemisch und molekularbiologisch definierte Faktoren führen zur Ausbildung der MDR:

1. Der klassische MDR-Mechanismus, auch typische MDR genannt, wird charakterisiert durch Expression des MDR1-Genes (FOJO et al., 1987; KAKEHI et al., 1988; KANAMARU et al., 1989; MICKISCH et al., 1990). Die MDR-Gene kodieren sogenannte **P-170-Glykoproteine** (Pgp), wobei P für Permeabilität steht und 170 das relative Molekulargewicht (kD) angibt. Diese Plasmamembranproteine bestehen aus ca. 1280 Aminosäuren, 12 transmembranäre Strukturen und 2 ATP-Bindungsstellen zur Energieversorgung (GOTTESMAN und PASTAN, 1993; GOTTESMAN et al., 1994). Es handelt sich um ein energieabhängiges Transportprotein, das viele hydrophobe Substanzen aus der Zelle eliminiert. P-Glykoprotein vermindert die intrazelluläre Konzentration der Zytostatika, durch aktives, energieabhängiges Herauspumpen der Zytostatika aus der Zelle. P-Glykoprotein fungiert als „Effluxpumpe“. Speziell an der Niere ist Pgp im proximalen Tubulus, im Mesangium, im dicken Schenkel der Henle'schen Schleife und im Sammelrohr lokalisiert. Aufgrund der hohen Exkretionsfähigkeit und breiten Substrataffinität, kann Pgp die Zelle vor Giftstoffen schützen. Der Nachteil ist, dass Pgp auch für den Auswärtstransport von Chemotherapeutika, noch bevor sie wirksam werden können, verantwortlich ist (MICKISCH, 1993; VOLM et al., 1992). Pgp soll auch am Transport von Steroidhormonen beteiligt sein (MICKISCH, 1994c).

Die Expression von Pgp kann durch monoklonale Antikörper gemessen werden (VAN KALKEN et al., 1991).

EFFERTH und VOLM (1992b) analysierten die Beziehung zwischen Proteinexpres-

sion von Protoonkogenen und erworbener oder vorhandener MDR. Sie fanden, dass einige Onkogene (c-fos und c-erb B1) eine Rolle in der Entwicklung der MDR spielen und andere wiederum keine Beziehung zu Proteinen besitzen, d.h. Zellen können eine MDR ohne Pgp-Expression entwickeln.

Im Nierenzellkarzinom existiert eine signifikante Beziehung zwischen den Resistenz-Faktoren (Pgp, Glutathion S-Transferase, Topoisomerase II) und den Protoonkogenen (c-fos, c-erbB1, c-neu) (VOLM et al., 1993).

2. Die Topoisomerase II ist ein Enzym, das die Konfiguration von einzel- oder doppelsträngiger DNA katalysiert, hierdurch steht sie in enger Beziehung zum Zellwachstum und scheint eine wesentliche strukturelle und funktionelle Komponente des Zellkernes zu sein (MICKISCH, 1994c). Man spricht hier von der atypischen MDR. Beispielsweise interferieren Anthrazykline mit der Topoisomerase II und stabilisieren somit die DNA in der Replikationsphase (VOLM et al., 1992). Die Downregulation dieses Enzymes wurde durch den niedrigen Anteil der Zellen in der S-Phase deutlich (SCHELTEMA et al., 1994; TANDON et al., 1991).
3. Glutathion stellt das stärkste Reduktionspotential der Zelle dar. Verschiedene Enzyme des Glutathionsystems sind für die Entgiftung der Zelle verantwortlich (HANJONG et al., 1994; MICKISCH, 1994c; VOLM et al., 1992). Auch dieser Stoffwechselweg wird zur atypischen MDR gezählt. Glutathion vermindert nicht die Zytotoxizität von Vinblastin, kann aber die Sensitivität gegenüber Cisplatin oder Doxorubicin verringern (HANJONG et al., 1994). Ein Beispiel für die Kreuzresistenz gegen Chemotherapeutika sind Anthrazykline oder Alkylantien, deren zytostatische Wirkung zum Teil auf oxidative DNA-Schädigung beruht und durch glutathiongesteuerte Reduktionsvorgänge verursacht werden kann (MICKISCH, 1994a).

Andere Mechanismen, wie die MDR-assozierten Proteine (MRP) werden gegenwärtig untersucht. Membranproteine, die den ATP-abhängigen Transport von Anionen aus der Zelle ermöglichen, wurden als Mitglieder der Familie von MDR-Proteinen identifiziert. Die Aufklärung der Funktion des **M**ultidrug **R**esistance-associated **P**roteins 1 (MRP1) führte zur molekularen Identifizierung und Klonierung von MRP2. MRP2, der **c**analicu-**l**ar **M**ultispecific **O**rganic **A**nion **T**ransporter (cMOAT), ist eine Konjugat-Exportpumpe in der Bürstensaum-Membran der proximalen Nierentubuli (siehe **Abbildung 1**). Beide Proteine sind integrale Membranglykoproteine mit einer molekularen Masse von etwa 190 kD. Ihre Aminosäuresequenzen sind zu 49 % identisch. In malignen Tumoren kann

ihre Überexpression zu einer Resistenz gegenüber mehreren Zytostatika führen. Neben der Chemoresistenz sind sie auch am Austransport glutathionkonjugierter Substanzen beteiligt (KEPPLER et al., 1998b).

Interessant ist, dass das MRP bei Mäusen in den Glomeruli und in der Basolateralmembran des distalen Tubulus und des Sammelrohrs gefunden wurde, nicht aber in den Zellen des proximalen Tubulus (PENG et al., 1999).

Weitere Untersuchungen berichten neben den Transportproteinen MRP1 und 2 bereits über MRP3-6, die ebenfalls bei Überexpression in Tumorzellen zur MDR führen könnten (BORST et al., 1997).

Die Existenz des Pgp ist nicht ausreichend für die Erklärung der MDR. Andere Faktoren, wie die Glutathion S-Transferase, das MRP, die Topoisomerase II, die Proteinkinase C und DNA-Reparaturenzyme tragen auch zu dem Komplex der MDR bei. Das große Problem besteht darin, dass die Modulation des Pgp durch die anderen Mechanismen beeinflusst werden kann, wodurch verschiedene Resistenztypen untereinander verknüpft werden können (EFFERTH et al., 1995).

## **1.4 Therapieansätze: Von *in vitro*-Untersuchungen bis zur klinischen Anwendung**

Das Nierenzellkarzinom nimmt in der Erforschung der MDR einen zentralen Platz ein. Nahezu alle Nierenzellkarzinome sind chemoresistent und weisen in einem hohen Prozentsatz das MDR1-Gen auf. Um eine erfolgreiche Therapie der Nierenzellkarzinome und ihrer Metastasen zu erreichen, muss das Phänomen MDR überwunden werden. Die Strategie der Chemosensitivierung beinhaltet drei Wege: die Umkehrung, die Umleitung oder die Überwindung der MDR (MICKISCH, 1994b). Substanzen, die die Chemoresistenz durchbrechen können, indem sie die Funktion des MDR1-Genproduktes (P-Glykoprotein) hemmen, nennt man Chemosensitizer. Der erste Sensitizer war der Kalziumantagonist Verapamil. Die Entwicklung führte zum weniger toxischen Enantiomer R-Verapamil, das am P-Glykoprotein das energieabhängige Herauspumpen der Zytostatika aus der Zelle blockiert, wodurch es zum Absterben des Tumors kommt. Ein weiterer Chemosensitizer ist das Buthioninsulfoximin (BSO), welches die Glutathionsynthese blockiert, wodurch die Zelle an Glutathion verarmt und abstirbt. Durch die Kombination

von Verapamil und BSO konnte die Resistenz bei einigen Nierenkarzinomzell-Linien komplett durchbrochen werden, was durch einen synergistischen Effekt beider Substanzen zu erklären ist. Andere Sensitizer, wie Cyclosporin A, Tamoxifen, Amphotericin B, Reserpin, u.a., sind bekannt (MICKISCH et al., 1990).

Noch scheiterten die klinischen Anwendungen an den erforderlichen hohen Dosen und den damit verbundenen Nebenwirkungen (z.B. Myelosuppression).

Die Entwicklung neuer Chemosensitizer mit geringeren Nebenwirkungen und erhöhter Fähigkeit, die Resistenz zu durchbrechen, besitzt hohe Priorität in der aktuellen Resistenzforschung. MICKISCH et al. (1991b) kombinierten Verapamil mit einer Vinblastin-Chemotherapie und konnten so die MDR in Primärkulturen menschlicher Nierenzellkarzinome überwinden. Eine ähnliche, aber schwächere Wirkung fand sich in der Kombination mit Doxorubicin- bzw. Daunomycin-Chemotherapie. Verapamil in Kombination mit Vinblastin wies eine geringere Toxizität auf und zeigte bei niedrigeren Konzentrationen stärkere Wirksamkeit. Die Substanz S 9788, ein neues Triazinoaminopiperidin-Derivat, das sich aus einer Serie von Triazene zur Blockierung der MDR-Modulation als am besten geeignet erwies (DHAINAUT et al., 1992), hob die Doxorubicinresistenz an menschlichen Nierenzellkarzinomen auf (EFFERTH et al., 1993). Es konnten ähnliche Effekte wie für Verapamil (Bindung an Pgp hemmt den Medikamenten-austransport), aber bei niedrigerer Konzentration, als Wirkungsmechanismus aufgezeigt werden (PIERRE et al., 1992).

CHAMBERS et al. (1990) lieferten den direkten Beweis für die Regulation des Pgp durch Proteinkinase C. Sie fanden heraus, dass das Pgp von der Proteinkinase C phosphoryliert wird. Die Tatsache, dass die Proteinkinase C an der MDR beteiligt ist, kann dazu beitragen, die Resistenz der Tumorzellen durch PKC-Hemmer aufzuheben (EFFERTH und VOLM, 1992a).

Die onkologische Forschung auf diesem Gebiet brachte, bis auf wenige Ausnahmen, eher enttäuschende Therapieergebnisse. Einige alternative Methoden wären, die Zerstörung des Pgp, die Blockierung der Pgp-Aktivität mit „falschen“ Substraten oder die liposomale Einkapselung des Medikamentes, wodurch

1. die Affinität zur Pgp-Bindung reduziert werden könnte,
2. direkt oder indirekt die Transportfunktion von Pgp gehemmt werden könnte,
3. eine Modifizierung der Phosphorlipidmembranstruktur hervorgerufen werden könnte, die eine funktionelle und/oder sterische Veränderung von Pgp zur Folge hätte,

4. und durch Umkehr der Transportrichtung zum Medikamenteneintransport führen würde (MICKISCH, 1994c).

Durch liposomale Einkapselung von Doxorubicin ließ sich der therapeutische Effekt um das 2-4fache steigern (MICKISCH et al., 1993).

Andere Methoden, die auf der körpereigenen Immunabwehr basieren, publizierte MICKISCH (1993) in seinen Untersuchungsergebnissen. Hierzu ist folgendes bekannt:

1. Zytokine führen zu keiner echten Überwindung der Resistenz, sondern zur „Umgehung“ der Zellmembranenbarriere durch Veränderung der Phosphorlipidstruktur, die funktionelle oder sterische Behinderungen der P-Glukoproteine zur Folge haben.
2. Monoklonale Antikörper (MRK16) alleine ließen *in vitro* und *in vivo* keine spezifische Zytotoxizität erkennen, aber in Kombination mit Vincristin konnte die MDR in Zellkulturen partiell überwunden werden. MRK16 führt zur Konfigurationsänderung von P-Glukoprotein und dadurch zu intraplasmatisch maskierten Medikamentenbindungsstellen. Zusammengefasst heißt das, dass monoklonale Antikörper im Prinzip zur Überwindung der MDR geeignet sind.
3. Toxine wie Ricin, Pseudomonas-Exotoxin (PE) und Diphtherie-Toxin binden an Zelloberflächen, werden dort internalisiert und in einer Kette von Reaktionsschritten aktiviert, schließlich blockieren sie die Proteinsynthese irreversibel durch Hemmung des Elongationsfaktors 2. Diese Toxine besitzen eine sehr hohe Wirksamkeit, nur wenige Moleküle genügen, um die Tumorzelle zu zerstören. Sie sind daher potentiell zur Krebstherapie geeignet. Allerdings muss aber die unspezifische Toxizität verhindert werden, um therapeutischen Nutzen zu erzielen. Man spricht in diesem Fall vom dem Konzept der „molekularen Therapiesteuerung“ (PASTAN und FITZGERALD, 1991).

Gentechnisch werden modifizierte Toxine an Zellbindungsproteine, wie monoklonale Antikörper oder Wachstumsfaktoren, gebunden. MICKISCH (1993) publizierte Versuche mit MRK16-PE, ein Immuntoxin gegen menschliches P-Glykoprotein. Da Toxine und konventionelle Chemo- und Immuntherapeutika über verschiedenartige Mechanismen wirken, besteht keine Gefahr der Kreuzresistenz. Ferner vernichten Toxine auch Krebszellen außerhalb der Teilungsphase. Immunologische Verfahren gelten als interessante Alternative, da der Wirkmechanismus in einer Veränderung der Plasmamembranarchitektur mit nachfolgender Aktivitätsminderung von P-Glykoprotein besteht. Es werden ihnen hohe Spezifität und Selektivität zugeschrieben (MICKISCH et al., 1993).

Weitere Therapieansätze in der Gen- und Immuntherapie erwiesen sich als notwendig. Gentherapie ist definiert als Übertragung genetischen Materials in Zellen eines Organismus, um Erkrankungen zu behandeln. Zwei uro-onkologisch relevante Konzepte, wie der Tumorstimulation und die molekulargenetische Modifikation an tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL-Zellen), sollten erwähnt werden:

1. Unter Tumorstimulation versteht man den Einbau von Genen für Zytokine in die Tumorzellen, die zur besseren Immunerkennung der modifizierten Tumorzelle führt und zusätzlich zytolytische Immunzellen im Wirtsorganismus erzeugt (ASHER et al., 1991; COLOMBO et al., 1991; GANSBACHER et al., 1990).
2. TIL-Zellen werden aus reseziertem Tumorgewebe durch Kultivierung einer Einzelzellsuspension in Interleukin-2 gewonnen, diese wachsen gut unter diesen Bedingungen und zerstören spezifisch die zugesetzten Tumorzellen (ROSENBERG et al., 1986). Die klinischen Ergebnisse beider Strategien waren dennoch bisher enttäuschend (ROSENBERG, 1991).

MIZUTANI et al. (1994) konnten in einer Studie belegen, dass der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), einen möglichen Mechanismus für die Resistenz von Nierenkarzinomzellen darstellt. Mit Hilfe von Pentoxifyllin konnte die TNF- $\alpha$ -Genexpression unterdrückt und somit die MDR überwunden werden. Ähnliche Ergebnisse konnten mit Adriamycin erzielt werden (SAFRIT et al., 1993).

Aus ethischen Überlegungen heraus wurden viele klinische Verfahren nicht weiterentwickelt. Das Hauptproblem der Therapie des Nierenrindenzellkarzinoms ist die unvollständige Hemmung der MDR und die gleichzeitige Expression der MDR im gesunden Gewebe. Dosissteigerung, die eine Heilung erzwingen könnte, sind wegen der Nebenwirkungen der meisten Chemotherapeutika unmöglich. Solange nicht selektivere Zytostatika zur Verfügung stehen, werden empfindliche Wechselgewebe, wie das Knochenmark, die maximal tolerablen Dosen limitieren. Hochdosierte Chemotherapie führt zur Myelosuppression, da Knochenmarkszellen keinen nennenswerten Gehalt an P-Glykoprotein als Schutzfaktor aufweisen. Für Medikamente, deren Maximaldosis vor allem durch das Ausmaß der Myelosuppression bestimmt wird, wurde das Konzept der Autotransplantation mit MDR1-transfiziertem Knochenmark entwickelt. Als Vorteil dieser neuartigen Strategie gilt, dass die Transplantation von MDR-Knochenmarkszellen lange vor der Hochdosis-Chemotherapie zu einem weit günstigeren Zeitpunkt durchgeführt werden kann. Zusätzlich kann der Patient über den gesamten Behandlungszeitraum sein intaktes Knochenmark nutzen, da dieses durch MDR1-Expression geschützt ist, und außerdem

ist eine flexiblere Zeitplanung während der Chemotherapie möglich. Aber starke Chemo-resistenz, die durch die MDR1-Expression im Knochenmark verursacht wird, muss eine strenge Risikoabwägung für eine Anwendung dieses Konzeptes beinhalten. Wenn zum Beispiel transplantierte MDR-Knochenmarkzellen später maligne entarten, wäre es aus naheliegenden Gründen schwierig, sie durch klassische Chemotherapie zu behandeln (MICKISCH, 1992).

Das Prinzip der „Intensivierung der systemischen Tumorthherapie“ hat große klinische Resonanz gefunden. Es ist aber auch bekannt, dass das bisher Erreichte bei einer Reihe solider Tumoren u.a. der Niere in kurativer Hinsicht nicht überzeugen kann und innovative Ansätze erforderlich sind. KAJIJI et al. (1994) beschrieben neue Chemosensitizer, welche eine höhere Affinität zu veränderten Pgp-Formen in Tumorzellen haben, als im Vergleich zu normalen Pgp (dem sogenannten wildtype). Die 3. Generation von Modulatoren könnten die Fähigkeit besitzen, zwischen MDR der Tumorzellen mit mutierten Pgp und der in gesundem Gewebe mit wildtype-Pgp zu unterscheiden (EFFERTH et al., 1995).

Ein allgemeines, allen Tumoren innewohnendes Resistenzprinzip gibt es nach unserem gegenwärtigen Kenntnisstand nicht. Es werden je nach Tumor mehrere MDR-Mechanismen angenommen, die dann auch eine multiple Therapie mit Chemosensitizern erfordern würden (MICKISCH und SCHRÖDER, 1996).

Die Euphorie vieler Wissenschaftler Anfang der 90-iger Jahre, durch unterschiedliche Strategieansätze die MDR zu überwinden und eine geeignete, sichere Therapie gegen das NZK zu erforschen, wurde durch die Komplexität dieses MDR-Phänomens gebremst. Es gab in den letzten Jahren kaum neue, effektive Methoden, die die Behandlung des NZK entscheidend verbesserten, so dass man immer noch auf dem Gebiet der Grundlagenforschung und in klinischen Studien nach neuen Ansätzen suchen muss.

Klinisch bestehen weitverbreitete Zweifel an der Wirksamkeit einer klassischen Chemotherapie im Rahmen der Behandlung des Nierenzellkarzinoms. Da es aber derzeit keine zuverlässigen Therapien für metastasierende Tumoren gibt, werden neue Behandlungskonzepte auch unter Einbeziehung chemotherapeutischer Verfahren dringend benötigt.

## **1.5 Versuchsgrundlagen und Zielstellung**

Die MDR im Nierenzellkarzinom hat seit 1986 zunehmend an klinischer Bedeutung gewonnen. Definitiv sind die Forschungsergebnisse am metastasierenden Nierenzell-

karzinom nicht befriedigend, weitere präklinische Daten sind erforderlich, um eine innovative, erfolgreiche Chemotherapie zu entwickeln. Da sich bisher die MDR des Nierenzellkarzinoms nicht medikamentös durchbrechen ließ, wurde in unserer Arbeit versucht, durch eine Steigerung des Eintransportes von Pharmaka in die Tumorzellen, deren Konzentration in der Zelle zu steigern und dadurch der MDR entgegenzuwirken. Als Modelsubstanz diente zunächst p-Aminohippursäure (PAH). Diese Substanz wird sowohl durch glomeruläre Filtration als auch durch tubuläre Sekretion ausgeschieden. Die tubuläre Sekretion kann ein Transportmaximum erreichen. Oberhalb einer maximalen PAH-Konzentration im Blut ist der Transportmechanismus gesättigt (max. tubuläre Transportleistung =  $T_m$ ). Der  $T_{mPAH}$ -Wert ist ein Maß für das funktionstüchtige sekretorische Nierengewebe. Organische Anionen wie PAH, werden im Austausch gegen intrazelluläre  $\alpha$ -Ketoglutarate durch die basolaterale Membran des proximalen Nierentubulus transportiert, ein Mechanismus, der als indirekter  $Na^+/\alpha$ -Ketoglutarat Cotransport bezeichnet wird (VILLALOBOS et al., 1996). Seit ca. 20 Jahren ist bekannt, dass die Nierentransportkapazität schwacher organischer Säuren durch geeignete Vorbehandlung *in vivo* (STOPP und BRÄUNLICH, 1980) stimuliert werden kann, z.B. durch PAH selbst, durch Penicillin, durch Hormone (wie Triiodthyronin, Dexamethason oder Insulin) und durch den epidermalen Wachstumsfaktor (FLECK und BRÄUNLICH, 1995; FLECK und PERTSCH, 1998). An der erwachsenen Ratte konnte BRÄUNLICH et al. (1986, 1987) einen Anstieg der PAH-Exkretion sowie der PAH-Akkumulation in Nierenrindenschnitten nach *in vivo*-Stimulation mit Triiodthyronin zeigen; wogegen die Dexamethasonvorbehandlung hier keinen Stimulationseffekt hervorrief. Die Transportkapazität und der Effekt der Stimulierbarkeit sind altersabhängig; 10 Tage alte Ratten mit noch unreifer Nierenfunktion lassen sich deutlich besser stimulieren als erwachsene Ratten (FLECK und BRÄUNLICH, 1990).

Auf der Grundlage dieser Versuche von BRÄUNLICH et al. (1986, 1987) wurde im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FSU ein neuer *ex vivo*-Versuchsansatz entwickelt. Die Stimulation des PAH-Transportes sollte durch Zusatz geeigneter Stimulatoren ( $T_3$ , Dexamethason, EGF) erfolgen. Diese wurden dem Inkubationsmedium zugegeben, in dem Nierenrindenschnitte über 24-48 Stunden inkubiert wurden. Dadurch sollte zum einen der Tierverbrauch reduziert werden, zum anderen waren weiterführende Aussagen zum zellulären Mechanismus der Stimulation zu erwarten. Der erste Teil unserer Arbeit validierte diese Versuche an Nierenrindenschnitten der Ratte, als Grundlagen für Untersuchungen an menschlichem Nierengewebe. Analoge *in vitro*-



Versuche an Nierengewebe von Ratten sowie an gesundem Nierengewebe des Menschen wurden parallel zu unserer Arbeit durch KRATOCHWIL und WINTERSTEIN durchgeführt. In diesen Untersuchungen nahm die PAH-Akkumulation nach Inkubation der Nierenrindenschnitte mit Dexamethason konzentrationsabhängig zu (131% Ratte, 156% Mensch), wogegen Triiodthyronin bei menschlichem Nierengewebe keine Wirkung auf die PAH-Akkumulation zeigte und bei der Ratte sogar zu einer signifikanten Abnahme der PAH-Aufnahme führte (FLECK et al., 1998). Prinzipiell lässt sich somit eine *in vitro*-Stimulation der tubulären PAH-Transportkapazität auch an menschlichen Nierenrindenschnitten nachweisen. Unterschiedliche Wirkungen von Dexamethason und Triiodthyronin lassen darauf schließen, dass beide Hormone die Transportleistung der Tubuluszelle nicht in gleicher Weise beeinflussen.

Erste Versuchsreihen zur tubulären PAH-Transportkapazität an Nierenzellkarzinomgewebe, deren Versuchsbedingungen und Methoden auf denen der Ratten basierten, wurden durch FLECK et al. (1997a) durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass das Gewebe von Nierenzellkarzinomen nicht in der Lage ist, aktiv PAH zu akkumulieren. Es stellte sich daher die Frage, ob es möglicherweise zu einem vermehrten Austransport von PAH im Sinne der MDR kommt. Die bekannte Unempfindlichkeit von Nierenzellkarzinomen und deren Metastasen gegenüber Zytostatika, die bereits ausführlich dargestellt wurde, wird mit der Expression von MDR-Transportern begründet, welche das Phänomen des gesteigerten Austransportes von Arzneimitteln aus den Zellen erklärt. Obwohl die passive Aufnahme von Zytostatika in der Niere von großer Bedeutung ist, kann auch die aktive Aufnahme dieser Substanzen nicht ausgeschlossen werden. Es ist denkbar, dass sich der aktive bzw. passive Eintransport von Pharmaka in die Zellen des Nierenzellkarzinomes auf der einen Seite und deren aktiver Austransport auf der anderen Seite gegenseitig aufheben.

Daraus ergab sich die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit: Besteht die Möglichkeit der Steigerung der Akkumulation von Chemotherapeutika durch geeignete Vorbehandlung, wie es am Beispiel der PAH bei gesundem Nierengewebe von Ratte und Mensch gezeigt werden konnte, auch für Zellen des NZK oder überwiegt auch nach Stimulation der Austransport aus dem NZK?

Zur Vorbehandlung wurden die beiden Hormone Dexamethason und Triiodthyronin, über deren Wirkung bereits zahlreiche Ergebnisse vorliegen, eingesetzt.

Dexamethason (9 $\alpha$ -Fluor-16 $\alpha$ -methylprednisolon) ist ein synthetisches Steroidhormon, das infolge seines zusätzlichen Fluor-Atoms eine 30fach stärkere Glukokortikoidwir-

kung als Kortisol besitzt und keine relevanten mineralokortikoide Wirkungen aufweist. Glukokortikoide üben im Organismus einen differenzierten Einfluss auf den Kohlenhydrat-, Eiweiß- und Fettstoffwechsel aus. Sie wirken meist katabol, indem sie den Proteinabbau fördern und die Gluconeogenese stimulieren (NEUMANN et al., 1992). Allerdings wirken sie auch fördernd auf die Synthese einiger Proteine, z.B. der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase und möglicherweise auch auf die Synthese von Transportproteinen in der Niere. Hier existieren hochaffine Rezeptoren für Glukokortikoide (FANESTIL und PARK, 1981). Über die kontraluminale Seite werden Glukokortikoide sehr schnell in die Tubuluszelle eintransportiert. Dabei interagieren sie wahrscheinlich mit dem PAH-Transportsystem (ULLRICH et al., 1991). Im Zytosol werden sie gebunden und bilden Hormon-Rezeptor-Komplexe, die in den Nukleus transloziert werden und dort über Interaktion mit spezifischen Akzeptorstellen am Chromatin die Genexpression modulieren (YAMAMOTO, 1985). KLEIN et al. (1984) konnten eine Erhöhung der Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase in der Nierenrinde nach Behandlung mit Glukokortikoiden nachweisen. Triiodthyronin ( $\text{T}_3$ ) - das biologisch wirksamere Hormon der Schilddrüse, wird zu 80% extrathyreoidal durch Deiodierung aus Thyroxin ( $\text{T}_4$ ) gebildet und wirkt schneller als Thyroxin. Beide greifen regulativ in den Energiestoffwechsel ein. Die biologische Halbwertszeit von  $\text{T}_3$  beträgt 1-2 Tage. Die Wirkung von  $\text{T}_3$  beruht wahrscheinlich auf einer Steigerung der Proteinsynthese und einer Beeinflussung der posttranslationalen Modifikation von Membranproteinen sowie einer direkten Beeinflussung der Membranpermeabilität (CAPASSO et al., 1987). Über Plasmamembranrezeptoren erfolgt die zelluläre Aufnahme von  $\text{T}_3$ . Im Zellkern an Non-Histon-Proteine gebunden, bewirkt es eine Erhöhung der mRNA-Synthese (De NAYER, 1987). Eine Erhöhung der Aktivität und Anzahl von  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase-Einheiten in der Nierenrinde von Ratten, aufgrund einer gesteigerten Enzymsynthese durch  $\text{T}_3$ , wurde von KLEIN et al. (1984) beschrieben.

Das Ziel unserer Arbeit war es, eine Stimulierung der PAH-Akkumulation am menschlichen Nierenzellkarzinom hervorzurufen, um somit einen ersten Anhaltspunkt zu haben, ob sich auch die Aufnahme von Zytostatika in die Tubuluszellen stimulieren lässt. Gelänge dies, wäre eine neue Möglichkeit zur Überwindung der MDR gegeben und ein weiterer Schritt in Richtung einer effektiven Tumorthherapie möglich. Allerdings lässt sich nicht ausschließen, ob durch unsere *in vitro*-Stimulation nicht gleichzeitig auch der Austransport von Arzneimitteln beschleunigt wird. Selbstverständlich darf bei allem Optimismus nicht außer acht gelassen werden, dass der Transport von PAH im Nieren-

gewebe sich von dem der meisten Zytostatika, die als lipophile Substanzen v.a. passiv in die Zelle gelangen, unterscheidet und unsere Versuche somit in erster Linie ein Beitrag zur Grundlagenforschung und weniger zur klinischen Therapiestrategie darstellen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Untersuchungsmaterial

#### 2.1.1 Tierversuche

Die Voruntersuchungen (Beginn: November 1995) zur Standardisierung des Versuches an menschlichen Nierenrindenschnitten wurden an Nierengewebe von weiblichen Wistarratten (Han: WIST) aus dem Auszuchtstamm der Koloniezucht des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena durchgeführt. Das Alter der Tiere betrug  $60 \pm 5$  Tage. Die Ratten, welche in Gruppen zu 6 Tieren pro Käfig (35 cm x 55 cm x 18 cm) untergebracht waren, wurden unter standardisierten Bedingungen bei einer Raumtemperatur von  $22 \pm 2$  °C, einer Luftfeuchtigkeit von ca. 50 % und einem Hell-Dunkel-Rhythmus (12/12 Stunden) im institutseigenen Tierhaus gehalten. Die Tiere wurden mit Standardfutter (Altromin 1316, Fa. Altromin, Lage, BRD) und Wasser ad libitum versorgt.

Die Organentnahmen wurden der Tierschutzkommission des Landes Thüringen angezeigt.

#### 2.1.2 Versuche an menschlichem Nierenzellkarzinomgewebe

Im Zeitraum von November 1996 bis Juli 2000 wurde Tumorgewebe von 32 Patienten, davon 17 männlichen und 15 weiblichen Geschlechts, in die Experimente einbezogen. Das Nierenzellkarzinomgewebe stammte von Patienten, die sich in der Klinik für Urologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena einer totalen Tumornephrektomie unterziehen mussten. Das Patientenalter lag zwischen 46 und 82 Jahren (Durchschnittsalter:  $65 \pm 2$  Jahre). Die nachfolgend aufgeführte **Tabelle 2** charakterisiert die Patienten, deren Gewebeproben zur Untersuchung gelangte. Das Alter der Patienten lag bei beiden Geschlechtern in der Mehrheit bei über 60 Jahren. Nur in wenigen Ausnahmen wurden Gewebeproben von Patienten unter 50 Jahren untersucht.

**Tabelle 2:** Charakterisierung des Patientengutes, dessen Gewebeproben (Nierenzellkarzinom = NZK) zur Untersuchung gelangten, nach Alter, Geschlecht, Operationszeitpunkt, Tumorart, Histologie, Nebenergebnissen und Diagnostik. Zur Histologie siehe auch **Tabelle 3**.

Patient	Name	Geb.-Datum	Geschlecht	OP-Datum	Tumorart	Histologie	Nebenergebnis	Diagnostik
1	B., H.	26.01.30	m	26.11.96	Klarzelliges NZK rechts	pT <sub>3b</sub> N <sub>0</sub> M <sub>1</sub> (Nebenniere)G <sub>2</sub>	Diabetes mellitus Typ 2a Cerebrovaskuläre Insuffizienz	Zufallsbefund bei Oberbauchdiagnostik
2	L., O.	05.01.28	m	28.11.96	Klarzelliges NZK rechts	pT <sub>3a</sub> N <sub>0</sub> M <sub>x</sub> L <sub>0</sub> V <sub>0</sub> R <sub>0</sub>	Hypertonie Hyperthyreose	Zufallsbefund
3	K., N.	20.09.24	w	10.12.96	Klarzelliges NZK links	pT <sub>3a</sub> N <sub>2</sub> M <sub>0</sub> L <sub>1</sub> V <sub>1</sub> R <sub>0</sub> G <sub>3</sub>	Hypertonie Cerebrovaskuläre Insuffizienz	Makrohämaturie
4	G., H.	13.08.27	m	09.01.97	Klarzelliges NZK links	pT <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>x</sub> L <sub>0</sub> V <sub>0</sub> R <sub>0</sub> G <sub>2</sub>	Myokardinfarkt Cholezystolithiasis Diabetes mellitus postoperativer Reinfarkt	Zufallsbefund
5	E., W.	27.03.41	m	15.01.97	Klarzelliges NZK rechts	pT <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>1</sub> R <sub>0</sub> G <sub>2</sub>	ZNS-Metastasen	Zufallsbefund bei ZNS-Metastasen
6	B., C.	26.05.53	w	20.01.97	Klarzelliges NZK links	pT <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>x</sub> L <sub>1</sub> V <sub>1</sub> R <sub>0</sub> G <sub>3</sub>	nicht bekannt	Makrohämaturie
7	J., A.	03.08.35	w	21.01.97	Klarzelliges NZK rechts	pT <sub>2</sub> N <sub>x</sub> M <sub>x</sub> L <sub>0</sub> V <sub>0</sub> R <sub>0</sub> G <sub>1</sub>	Cholezystolithiasis Migräne Hypotonie	Flankenbeschwerden
8	N., G.	29.07.36	m	17.02.97	Klarzelliges NZK links	pT <sub>2</sub> N <sub>2</sub> M <sub>1</sub> L <sub>0</sub> V <sub>0</sub> R <sub>0</sub> G <sub>2</sub> primär Lungenmetastasen	nicht bekannt	Zufallsbefund bei Vorsorge- untersuchung
9	F., E.	17.01.17	w	14.04.97	Klarzelliges NZK links	pT <sub>2</sub> N <sub>x</sub> M <sub>x</sub> L <sub>0</sub> V <sub>0</sub> R <sub>0</sub> G <sub>2</sub>	Chronisch-ischämische Herzkrankheit Absolute Arrhythmie Hyperthyreose Hemiparese links	linksseitige Abdominalbeschwerden
10	B., D.	10.02.49	m	13.03.97	Klarzelliges NZK links	pT <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> R <sub>0</sub> G <sub>2</sub>	Stammganglienblutung rechts Hypertonie Hemiparese links	Zufallsbefund

Patient	Name	Geb.-datum	Geschlecht	OP-Datum	Tumorart	Histologie	Nebenbefund	Diagnostik
11	H., H.	30.01.30	w	22.09.97	Klarzelliges NZK rechts	pT <sub>1</sub> N <sub>x</sub> M <sub>x</sub> L <sub>0</sub> V <sub>0</sub> R <sub>0</sub> G <sub>1</sub>	Hypertonie Herzinsuffizienz Chronisch-obstruktive Lungen- erkrankung Zustand nach Cholezystektomie Zustand nach Thrombophlebitis	Zufallsbefund
12	B., E.	17.08.22	w	28.04.97	Klarzelliges NZK rechts	pT <sub>2</sub> N <sub>x</sub> M <sub>x</sub> L <sub>0</sub> V <sub>0</sub> R <sub>0</sub> G <sub>2</sub>	Hypertonie Zustand nach Cholezystektomie	Zufallsbefund bei Sonographie
13	V., W.	31.08.23	w	10.07.97	Klarzelliges NZK rechts Multifokale Herde mit chromophilen Mikro-Karzinom	pT <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> L <sub>0</sub> V <sub>0</sub> R <sub>0</sub> G <sub>1</sub>	Chronisch-ischämische Herzkrankheit Hypertonie Vertebrogenes Schmerzsyndrom	Zufallsbefund bei Rückenschmerzen
14	E., W.	08.05.34	m	26.05.97	Klarzelliges NZK rechts	pT <sub>3a</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> L <sub>0</sub> V <sub>0</sub> R <sub>0</sub> G <sub>3</sub>	Hypertonie	Zufallsbefund bei Sonographie
15	L., H.	02.02.32	m	25.11.97	Klarzelliges NZK links	pT <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>x</sub> R <sub>0</sub> G <sub>2</sub> ( mit Zweittumor in Niere)	Adipositas Tinnitus Benigne Prostatahypertrophie Hypertonie	Zufallsbefund bei Diagnostik wegen Rippenfraktur
16	K., E.	09.06.31	w	18.11.97	Klarzelliges NZK rechts	pT <sub>2</sub> N <sub>x</sub> M <sub>x</sub> L <sub>0</sub> V <sub>1</sub> R <sub>0</sub> G <sub>2</sub>	Hypertonie Zustand nach Cholezystektomie	Mikrohämaturie
17	B., K.	23.06.42	m	21.05.97	Klarzelliges NZK links	pT <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>x</sub> L <sub>0</sub> V <sub>0</sub> R <sub>0</sub> G <sub>2</sub> sekundär pulmonale MTS	Metabolisches Syndrom Hypertonie Benigne Prostatahypertrophie	Unterbauchbeschwerden
18	H., R.	04.02.32	w	15.04.98	Klarzelliges NZK rechts	pT <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> R <sub>0</sub> G <sub>1</sub>	Hypertonie Hypothyreose Ulcus duodeni	Hämaturie und Rückenschmerzen

Patient	Name	Geb.-datum	Geschlecht	OP-Datum	Tumorart	Histologie	Nebenbefund	Diagnostik
19	F., E.	07.08.30	w	28.01.98	Chromophiles NZK rechts	pT <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> R <sub>0</sub> G <sub>2</sub>	Mamma-Ca.rechts (pT <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>x</sub> G <sub>2</sub> ) Diabetes mellitus Typ 2b	Zufallsbefund bei Umgebungsdiagnostik wegen Mamma- CA
20	A., F.	07.10.38	m	26.05.98	Klarzelliges NZK rechts	pT <sub>3a</sub> N <sub>0</sub> M <sub>x</sub> R <sub>0</sub> G <sub>3</sub>	Verdacht auf MTS LWK3 Zustand nach Hepatitis	Zufallsbefund bei Diagnostik wegen Rückenschmerzen
21	O., J.	26.08.43	m	03.06.98	Klarzelliges NZK links	pT <sub>3a</sub> N <sub>x</sub> M <sub>x</sub> L <sub>0</sub> V <sub>0</sub> R <sub>0</sub> G <sub>2</sub>	Prostata-Ca. Diabetes mellitus	Zufallsbefund CT
22	T., B.	29.06.32	w	29.01.99	Klarzelliges NZK rechts	pT <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> R <sub>0</sub> G <sub>2</sub>	Lungen-Tbc 1958 Psoriasis	Zufallsbefund
23	K., I.	27.04.34	w	03.02.99	Klarzelliges NZK links	pT <sub>3a</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> R <sub>0</sub> G <sub>1</sub>	Varikosis Hypertonie	Zufallsbefund CT
24	R., H.	14.08.32	m	27.04.99	Klarzelliges NZK rechts	pT <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> R <sub>0</sub> G <sub>2</sub>	Hypertone Herzkrankheit	Zufallsbefund nach Flankentrauma
25	H., U.	30.10.30	w	03.06.99	Klarzelliges NZK rechts	pT <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>1</sub> R <sub>0</sub> G <sub>2</sub>	Pulmonale Metastasen Hypertonie Diabetes mellitus	Sonographie, CT- Abdomen, CT- Thorax Urogramm
26	K., R.	28.06.32	m	14.09.99	Klarzelliges NZK links	pT <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>1</sub> R <sub>0</sub> G <sub>2</sub>	Ossäre Metastasen,	Sonographie, CT- Abdomen, Thorax, Urogramm, Skelettszintigraphie
27	N., O.	19.10.44	m	20.09.99	Klarzelliges NZK rechts	pT <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> R <sub>0</sub> G <sub>1</sub>	Zustand nach Pericarditis	Zufallsbefund
28	S., H.	15.04.21	m	18.10.99	Klarzelliges NZK	pT <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> G <sub>1</sub>	Diabetes mellitus Adipositas Chronisches Nierenversagen	Zufallsbefund bei Sonographie und CT- Abdomen, MRT
29	P., S.	17.02.31	w	11.11.99	Klarzelliges NZK	pT <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> G <sub>1</sub>	keine	Zufallsbefund bei Sonographie und CT- Abdomen
30	O., R.	01.12.38	m	23.11.99	Klarzelliges NZK	pT <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> G <sub>1</sub>	Hypertonie	Zufallsbefund bei Sonographie und CT- Abdomen
31	M., E.	18.12.47	w	05.06.00	Klarzelliges NZK	pT <sub>3b</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub> R <sub>0</sub>	nicht bekannt	nicht bekannt
32	K., R.	19.08.33	m	11.07.00	Klarzelliges NZK	pT <sub>3b</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> R <sub>0</sub>	nicht bekannt	nicht bekannt

Die Nierenzellkarzinome (NZK) wurden überwiegend als klarzellige NZK charakterisiert, wobei die Lokalisation die rechte und linke Seite gleichermaßen betraf. Histologisch befanden sich die meisten Tumoren im Stadium pT<sub>2</sub>. Neben altersspezifischen Erkrankungen waren bei 4 Patienten Metastasen des NZK bzw. andere maligne Tumoren diagnostiziert worden, wie z.B. Mamma-Karzinom, Lungenmetastasen sowie ZNS-Metastasen. Bei den meisten Patienten war das NZK ein Zufallsbefund.

Die histologische Differenzierung des NZK (s. **Tabelle 3**) erfolgte durch die TNM-Klassifikation der Vereinigten Internationalen Krebsorganisation (UICC):

**Tabelle 3:** TNM-Klassifikation nach UICC-Kriterien (prätherapeutische klinische Klassifikation)

<b>T</b>	<b>Primärtumor (Nierenzellkarzinom)</b>
T <sub>is</sub>	Präinvasives Karzinom
T <sub>0</sub>	Kein Anhalt für einen Primärtumor
T <sub>1</sub>	Tumorgröße < 7 cm; auf Niere beschränkt
T <sub>2</sub>	Tumorgröße > 7 cm; auf Niere beschränkt
T <sub>3a</sub>	Tumorinvasion in benachbartes Fettgewebe
T <sub>3b</sub>	Tumorinvasion in benachbarte Vene
T <sub>4</sub>	Tumorinvasion in benachbarte Organe
T <sub>x</sub>	Die Minimalerfordernisse zur Bestimmung des Sitzes oder Ausbreitungsgrades des Primärtumors liegen nicht vor
<b>N</b>	<b>Regionäre Lymphknoten</b>
N <sub>0</sub>	Kein Anhalt für einen Befall der regionären Lymphknoten
N <sub>1</sub>	Ipsilateraler Lymphknotenbefall, mobil
N <sub>2</sub>	Bilateraler Lymphknotenbefall, mobil
N <sub>3</sub>	Fixierter Lymphknotenbefall
N <sub>4</sub>	Befall juxta-regionärer Lymphknoten
N <sub>x</sub>	Die Minimalerfordernisse zur Beurteilung der regionären Lymphknoten liegen nicht vor (Beurteilung von mindestens 8 Lymphknoten erforderlich)
<b>M</b>	<b>Fernmetastasen</b>
M <sub>0</sub>	Kein Anhalt für Fernmetastasen
M <sub>1</sub>	Fernmetastasen vorhanden
M <sub>x</sub>	Die Minimalerfordernisse zur Beurteilung des Vorhandenseins von Fernmetastasen liegen nicht vor



<b>R</b>	<b>Residualtumor</b>
R <sub>0</sub>	Kein Anhalt für Residualtumor
R <sub>1</sub>	Mikroskopischer Residualtumor
R <sub>2</sub>	Makroskopischer Residualtumor
<b>G</b>	<b>Grading:</b> beschreibt den histologischen Differenzierungs- und Malignitätsgrad von malignen Tumoren und stellt einen prognoserelevanten Faktor für die Überlebensrate dar.
G <sub>1</sub>	Hochdifferenziertes Gewebe geringer Malignität
G <sub>2</sub>	Mitteldifferenziertes Gewebe mäßiger Malignität
G <sub>3</sub>	Niedrigdifferenziertes Gewebe hoher Malignität
„p“	Postoperative histopathologische Klassifikation (pTNM) unter Ergänzung oder Abänderung der prätherapeutischen TNM-Klassifikation durch die bei einem definitiven chirurgischen Eingriff und bei der histopathologischen Untersuchung des Resektionspräparates gewonnenen Erkenntnisse

Unmittelbar nach der Tumornephrektomie wurden die Gewebeproben in 4 °C kalter NaCl-Lösung auf Eis aufbewahrt und gelangten nach einer Transportdauer von ca. 30-60 Minuten durch einen Kurier von der Urologischen Klinik in das Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FSU Jena, wo die weitere Gewebevorbereitung für die *in vitro*-Experimente erfolgte. Die unterschiedlich langen Transportzeiten ließen sich logistisch nicht optimieren, so dass die gemessenen Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten z.T. durch die unterschiedliche Transportdauer erklärlich sind (siehe Ergebnisteil).

Zur Untersuchung gelangte Material mit einem durchschnittlichen Gewicht von 7,6 g pro Patient. Dabei wiesen die einzelnen Gewebestücke ein Gewicht von 3 g bis 23 g auf. Darin ist die zum Teil geringe Anzahl an Versuchsansätzen pro Patient begründet. Die Genehmigung zur Durchführung der Versuche an menschem Nierenzellkarzinomgewebe wurde von der Ethikkommission des Klinikums der FSU Jena erteilt.

## 2.2 Versuchsdurchführung

Die im folgenden beschriebenen Versuchsansätze dienen zur Klärung folgender Fragestellungen:

1. Vorversuche:
  - Einfluss der Inkubationsdauer auf die Akkumulation von PAH in Nierenrindenschnitten.
  - Einfluss verschiedener Inkubationsmedien auf die Akkumulationsfähigkeit von Nierenrindenschnitten für PAH.
  - Einfluss verschiedener Begasungen (O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, Carbogen) auf die Akkumulation von PAH in Nierenrindenschnitten.
2. Vergleich der PAH-Akkumulation in Nierenrindenschnitten von Ratte und Mensch
3. Vergleich der Akkumulationsfähigkeit von intaktem menschlichem Nierengewebe und NZK.
4. Einfluss von Dexamethason bzw. Triiodthyronin auf die Akkumulationsfähigkeit von Nierengewebeschnitten für PAH (Ratte, intaktes menschliches Nierengewebe, NZK).
5. Einfluss von Tumorstadium, Lebensalter und Geschlecht auf die Akkumulationsfähigkeit für PAH in menschlichem NZK.

### 2.2.1 Tierversuche

Zu Versuchsbeginn wurden die Ratten einer flachen Ethernarkose unterzogen. Nach anschließender Dekapitierung und sorgfältiger Entblutung, um eine Blutleere der Nieren zu erreichen, wurden nach einem medianen Abdominalschnitt die Nieren entnommen, dekapsuliert und in 4°C kalter 0,9%iger NaCl-Lösung bis zur Anfertigung der Schnitte aufbewahrt.

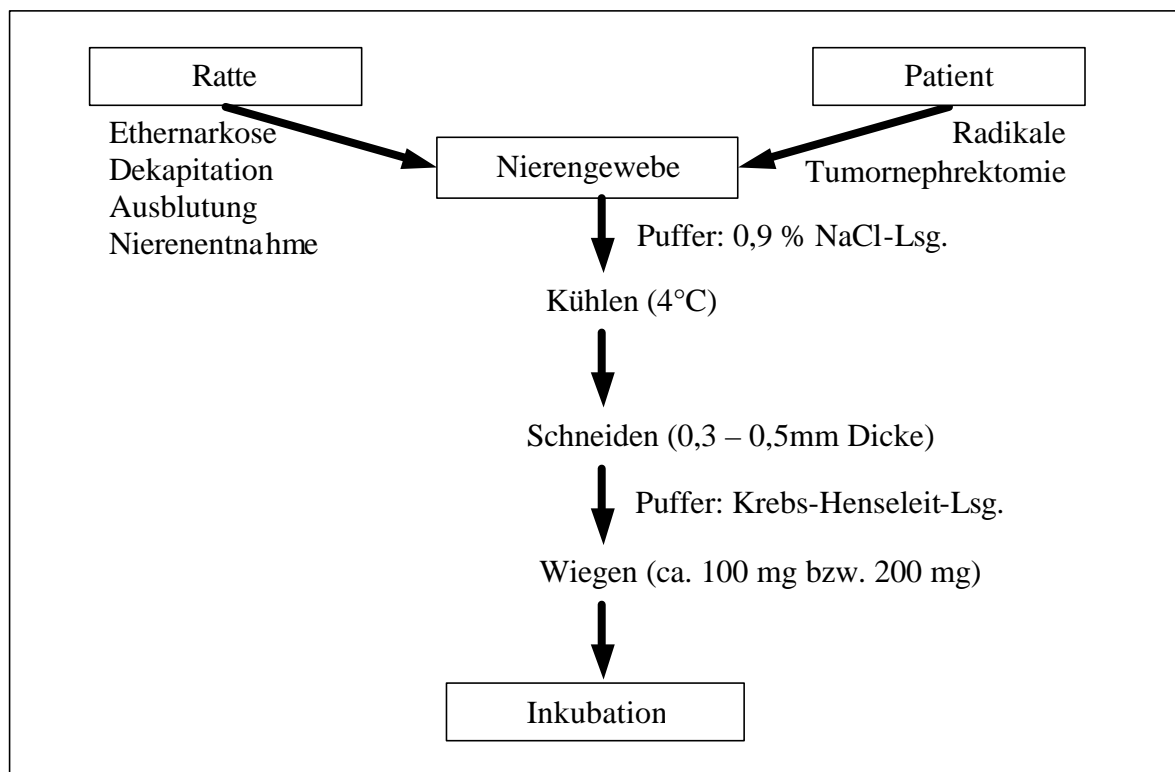
Danach erfolgte die Herstellung der Nierenrindenschnitte in einem Schneideblock. Dieser besteht aus einem Grundkörper in Form eines Quaders (12,5 cm x 8 cm x 4 cm). Ein daran befestigter Deckel aus durchsichtigem PVC dient der stabilen Fixation des Nierengewebes für die weitere Präparation. Mit einer Rasierklinge wurden freihand ca. 0,3 - 0,5 mm dicke Schnitte von der anterioren und posterioren Nierenoberfläche hergestellt. Sie enthalten ca. 70 % proximale Tubuluszellen der superfiziellen Nephrone (STOPP, 1982). Bei dieser Schnittdicke ist eine ausreichende Sauerstoffversorgung

auch der tiefer gelegenen Tubuluszellen gewährleistet (STOPP, 1982). Bis zur Einwaage wurden die Schnitte mit der Schnittfläche nach oben auf eisgekühlten Aluminiumschälchen bei 4°C gelagert. Bei längerer Verweildauer der Schnitte bis zu deren Weiterverarbeitung wurden diese in einer Krebs-Henseleit-Pufferlösung aufbewahrt, um die Funktionsfähigkeit des Gewebes aufrechtzuerhalten. Der Puffer hatte folgende Zusammensetzung: 40 ml 16,1% NaCl, 30 ml 1,1% KCl, 5 ml 3,0%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 ml 2,74%ige  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ , 10 ml 2,6%  $\text{CaCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ , 200 ml  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (gesättigt) und 167 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Diese Lösung wurde am Versuchstag 1:1 mit Aqua bidest. zu einer Stammlösung verdünnt. Einer 100 ml-Gebrauchslösung, bestehend aus 50 ml Krebs-Henseleit-Pufferstammlösung, 40 ml Aqua bidest. und 10 ml Phenolrot-Stammlösung (10 mg Phenolrot/ 100 ml Aqua bidest.) werden 300mg HEPES-Puffer zugefügt. Anschließend wird die Lösung 30 Minuten mit Carbogen (95%  $\text{O}_2$  / 5%  $\text{CO}_2$ ) begast und der pH-Wert mit 1 N HCl oder 1 N NaOH auf 7,4 eingestellt.

Das Fließschema in **Abbildung 2** soll den prinzipiellen Ablauf der Versuchsansätze für Untersuchungen an Nierengewebe von Ratte und Mensch (s. 2.2.2) verdeutlichen.

### **2.2.2 Versuche an menschlichem Nierenzellkarzinomgewebe**

Unmittelbar nach Anlieferung der Gewebeproben aus der Klinik für Urologie der FSU Jena wurden Gewebestücke vom Tumor wie folgt aufgearbeitet (s. **Abbildung 2**): Zunächst wurden Gewebeschnitte im Schneideblock mittels Rasierklinge angefertigt (s.o.). Trotz extrem unterschiedlicher morphologischer Eigenschaften der Präparate, so z.B. Konsistenzen, Zusammensetzung aus verschiedenen Gewebeanteilen, Wassergehalt etc. ließen sich hinreichend standardisierende Gewebeschnitte mit einer Dicke von 0,3-0,5 mm anfertigen. Die Schnitte wurden bis zur Einwaage auf eisgekühlten Aluminiumschälchen gelagert (4°C). Je nach Inkubationszeit (2 bzw. 24 Stunden) wurden unterschiedliche Gewebemengen (ca. 100 mg bzw. 200 mg) eingewogen. Unter Mitarbeit von weiteren Doktoranden, E. KRATOCHWIL und K. WINTERSTEIN, wurden ebenfalls Gewebeschnitte von „intaktem“ menschlichem Nierengewebe verwendet. Darunter ist makroskopisch/ mikroskopisch gesundes Nierengewebe tumorbefallener Nieren zu verstehen.



**Abbildung 2**

Schematische Darstellung der Präparation von Nierengewebe der Ratte und des Menschen

**Tabelle 4:** Einteilung der Versuche nach der entsprechenden Inkubationszeit und den verwendeten Inkubationsmedien

CTM = PAH-haltiges Cross-Taggart-Medium unter O<sub>2</sub> bzw. N<sub>2</sub>-Begasung

WEM = Williams E-Medium unter Carbogenbegasung

Gesamt-Zeit (in Stunden)	Frischgewebe 0 Stunden	Akutversuch 2 Stunden	2-h- Versuch 2+2 Stunden	24-h- Versuch 24+2 Stunden	48-h- Versuch 48+2 Stunden
0-2	ohne Inkubation	CTM	WEM	WEM	WEM
2-4			CTM	WEM	WEM
4-24				WEM	WEM
24-26				CTM	WEM
26-48					WEM
48-50					CTM

### 2.2.2.1 Akutversuche

Zur Klärung der Frage nach der Abhängigkeit der PAH-Akkumulation von der Inkubationsdauer wurden sowohl im Tierversuch als auch bei der Untersuchung menschlichen NZK zunächst Akut- und später Langzeitversuche durchgeführt (**Tabelle 4**). In den Akutversuchen wurden Gewebeschnitte von ca. 100 mg Gewicht auf einer Präzisionswaage (Sartorius Basic, MC 1 Laboratory LC 220 S, Sartorius AG, Göttingen, BRD) eingewogen. Als Inkubationsmedium wurde Cross-Taggart-Phosphatpuffer (pH = 7,4) verwendet. Die einzelnen Lösungen für das Inkubationsmedium (0,3 N NaCl, 0,3 N KCl, 0,02 M  $\text{CaCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ , 0,1 M Na-Phosphatpuffer, 0,001 M PAH) wurden vorrätig angesetzt und im Kühlschrank aufbewahrt. Am Versuchstag wurden die verschiedenen Lösungen in folgendem Verhältnis gemischt: 15,4 ml NaCl, 7,2 ml KCl, 2,0 ml  $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , 4,0 ml Na-Phosphatpuffer und 4,0 ml PAH-Lösung wurden mit einem gleichen Volumenanteil Aqua bidest. versetzt. Die Lösung hatte eine Osmolarität von 218 mosmol/l.

In 25 ml-Erlenmeyerkölbchen wurden 3 ml des Inkubationsmediums für 20 min einem Sauerstoffdurchfluss von ca. 2 l/h je Gefäß ausgesetzt, um einen optimalen Sauerstoffgehalt im Medium für die Funktionsfähigkeit der zu untersuchenden Gewebeproben zu gewährleisten. Die Aufteilung der Inkubationslösung in die Kölbchen erfolgte mittels Multipipette und Combitip (Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, BRD). Danach wurden die gewogenen Gewebeschnitte in die Kölbchen eingebracht, wobei auf ein freies Schwimmen der einzelnen Schnitte zu achten war, um die Akkumulationsfähigkeit für PAH nicht zu beeinträchtigen.

Während einer Zeit von 120 min wurden die Nierenrindenschnitte in einem Schüttelinkubator vom Typ Julabo SW-21C (Fa. Labortechnik GmbH, Seelbach, BRD) bei einem Sauerstoffdurchfluss von ca. 2 l/h je Kölbchen, einer Schüttelfrequenz von 90–100 Oszillationen pro min und einer Temperatur von 25°C inkubiert. Die genannten Parameter hatten sich in früheren Untersuchungen für die Durchführung von Kurzzeitversuchen an Nierengewebe der Ratte als optimal erwiesen (STOPP, 1982).

Je nach vorhandener Gewebemenge wurden pro Tierversuch bzw. pro Patient 1-4 Proben je Ansatz und jeweils 3 Proben ohne Gewebe zur Ermittlung des sog. Mediumbezugswertes verwendet.

#### 2.2.2.2 Langzeitversuche

In früheren Untersuchungen an Nierengewebe der Ratte und an gesundem menschlichen Nierengewebe ließ sich eine Stimulation der Akkumulationsfähigkeit für PAH durch Dexamethason *in vitro* nachweisen (Fleck, 1997). Darauf basierend sollen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit die Frage klären, ob eine *in vitro*-Stimulation der PAH-Akkumulation unter Dexamethasoneinfluss auch in menschlichem Nierentumorgewebe nach einer 24-stündigen Inkubationszeit möglich ist.

Für die Langzeitversuche wurden ca. 200 mg Schnittgewebe eingewogen. Als Inkubationsmedium wurde Williams E-Medium (Fa. Biochrom KG, Berlin, BRD) verwendet.

Zu Versuchsbeginn wurden 200 ml Williams E-Medium mit 58,4 mg L-Glutamin, 640 µl Insulin und 250 µl Gentamicin versetzt. Die Zusätze im Medium dienen der Aufrechterhaltung der Funktionstüchtigkeit der Schnitte während der Inkubationszeit und der Vermeidung einer bakteriellen Kontamination. Die Einwaage von L-Glutamin (Fa. Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) erfolgte mittels der Präzisionswaage (s.2.2.2.1). Insulin (Berlin-Chemie AG) wurde unter sterilen Kautelen aus der Ampulle entnommen. Die Zugabe von 250 µl Gentamicin (ratiopharm GmbH, Ulm, BRD) erfolgte ebenfalls durch Pipettierung. Alle chemischen Substanzen sind kommerziell erhältlich und von analytischer Qualität.

Nach Herstellung der Inkubationslösung wurde diese für 15-20 min mit Carbogen (5% CO<sub>2</sub> + 95% O<sub>2</sub>; Fa. Linde AG, Höllriegelskreuth, BRD) begast, um die Zellfunktionen der Gewebe zu gewährleisten. Anschließend wurde der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von 1 N NaOH bzw. 1 N HCl auf 7,4 eingestellt. Zur pH-Messung wurde das Digitalmessgerät vom Typ MV 870 (Fa. Präcitronic, Dresden, BRD) verwendet.

Mittels Multipipette und Combipipette (s.o.) wurden 10 ml der Inkubationslösung in 50 ml-Erlenmeyerkölbchen portioniert und nochmals für 20 s einer Carbogenbegasung unterzogen, bevor die gewogenen Gewebeschnitte eingebracht wurden.

Bei ca. 100 Schüttelbewegungen pro Minute, einer Temperatur von 30°C und einem Carbogendurchfluss von ungefähr 1 l/h je Kölbchen verblieben die Proben von Nierengewebe der Ratte bzw. NZK des Menschen (n = 1-4 je Ansatz + 3 Proben ohne Gewebe) für 24 Stunden im Inkubator (s. 2.2.2.1).

In einigen Untersuchungen an Nierengewebe der Ratte wurden zusätzliche Messungen der PAH-Akkumulation nach einer 2- bzw. 48-stündigen Inkubation in Williams E-Medium und anschließender zweistündiger Einbringung der Schnitte in PAH enthalte-

ner Cross-Taggart-Lösung durchgeführt. Im Ergebnisteil sind die Messwerte unter „2-h-Inkubation“ bzw. „48-h-Inkubation“ dargestellt (s. auch **Tabelle 4**).

Nach der Inkubation wurden die Schnitte vorsichtig mit einem Papierfilter getrocknet und das Gewicht durch eine Präzisionswaage (s.2.2.2.1) bestimmt. Danach wurden ca. 100 mg Schnittgewebe in 3 ml Cross-Taggart-Phosphatpufferlösung (s. 2.2.2.1), die sich in 25 ml-Erlenmeyerkölbchen befanden, eingebracht und für 2 Stunden mit PAH inkubiert.

Die PAH-Aufnahme vom Medium in das Schnittgewebe wurde anschließend bestimmt (s. 2.4).

Eine Verlängerung der Inkubationszeit (z.B. 48 Stunden) führte zu keinem weiteren Anstieg der PAH-Akkumulation in Nierenrindenschnitten von erwachsenen Ratten, wie in Vorversuchen festgestellt wurde. Zum gleichen Ergebnis gelangten auch frühere *in vitro*-Untersuchungen an Nierenrindenschnitten von Ratte und intaktem menschlichen Nierengewebe (FLECK, 1997; FLECK et al., 1998), so dass in den Langzeitversuchen dieser Arbeit eine Inkubationszeit von 24 Stunden gewählt wurde.

### **2.3 *In vitro*-Stimulation der PAH-Akkumulation in Nierenzellkarzinomgewebe**

PAH wurde als Testsubstanz zur Charakterisierung der tubulären Sekretionsfähigkeit an der basolateralen Membran der Tubuluszelle verwendet. Für die *in vitro*-Stimulation der PAH-Akkumulation in menschlichem Nierentumorgewebe während der Akutversuche wurden die Schnitte unmittelbar nach der Präparation in PAH-haltiges Cross-Taggart-Medium gegeben (s. 2.2.2.1). Zur Bestimmung der *in vitro*-Stimulation der PAH-Akkumulation in menschlichem Nierentumorgewebe während der Langzeitversuche wurde Williams E-Medium (s. 2.2.2.2) verwendet. Die Aufgabe des Inkubationsmediums ist es, die Schnitte während der Inkubationszeit am Leben zu halten. In Vorversuchen an der Ratte wurde auch das Inkubationsmedium Via-Span (Du Pont, Bad Homburg, BRD) getestet, wobei sich zeigte, dass Williams E-Medium für die Akkumulationsversuche besser geeignet war.

Die Beeinflussung der PAH-Akkumulation in den Nierentumorzellen durch die Hormone Dexamethason bzw. Triiodthyronin war Hauptgegenstand der vorliegenden Untersuchung. Verschiedene Konzentrationen von Dexamethason (Fortecortin<sup>®</sup> Mono, E.

Merck, Darmstadt, BRD) bzw. Triiodthyronin (Henning, Berlin, BRD) wurden dem Inkubationsmedium zugegeben.

Für die 24-stündige Inkubation der Schnitte wurde Carbogengas (s. 2.2.2.2) verwendet. In den anschließenden 2-stündigen Akkumulationsexperimenten erfolgte die Versorgung der Schnitte im PAH-haltigem Cross-Taggart-Medium mit reinem Sauerstoff (Fa. Linde AG, Höllriegelskreuth, BRD) mit einer Durchflussrate von 2 l/h je Kölbchen.

Wie schon STOPP (1982) in seinen Untersuchungen an Nierenrindenschnitten der Ratte feststellte, findet ausschließlich unter aeroben Bedingungen die PAH-Akkumulation statt. Eine N<sub>2</sub>-Begasung der Inkubationsgefäße (anaerobe Bedingungen) führt hingegen zu keiner PAH-Akkumulation. Die Versuche an gesundem menschlichem Nierengewebe bestätigen die Aussage von STOPP (Fleck et al., 1998).

In Anlehnung an STOPP und BRÄUNLICH (1975) wird die aktive PAH-Anreicherung in der Zelle durch das Verhältnis zwischen PAH-Konzentration im Schnitt und im Medium nach Beendigung der Inkubation (Schnitt-Medium-Quotient =  $Q_{S/M}$ ) ausgedrückt (s. 2.6.1).

## **2.4 Probenaufarbeitung**

Nach der 2-stündigen Inkubation der Nierenrindenschnitte in PAH-haltigem Cross-Taggart-Medium erfolgte die Trennung von Medium und Gewebe durch Papierfilter. Dazu wurde das Rundfilter (Fa. Filtrak, Niederschlag/Erzgebirge, BRD) der Größe 6 verwendet. Die Schnitte wurden anschließend vom Filter entnommen, sorgfältig abgetupft und das Feuchtgewicht für die Berechnung der PAH-Konzentration im Gewebe ( $\mu\text{g PAH/g Gewebe}$ ) auf o.g. Präzisionswaage ermittelt.

### **2.4.1 Homogenat**

Zur Herstellung des Homogenates wurden die Schnitte in einem Glasröhrchen mit 0,5 ml Aqua bidest. versetzt und homogenisiert (Homogenisator der Fa. Mechanik/ Prüfgeräte Medingen, BRD). Um alle Gewebepartikel zu erfassen, wurde 3 mal mit je 0,5 ml Aqua bidest. gespült und jeweils erneut homogenisiert.

Homogenat und Inkubationsmedium wurden nachfolgend mit 0,5 ml 20%iger Trichloressigsäure (Fa. Merck, Darmstadt, BRD) denaturiert. Nach einer Einwirkzeit von 10 Minuten erfolgte durch Zentrifugation (Zentrifuge vom Typ T 23 D MLW, Medizin-



technik Leipzig, BRD) bei einer Drehzahl von 4000 U/min und einer Zeit von 10 Minuten die Trennung in zelluläre Bestandteile und Überstand. Vom Überstand wurden 2,0 ml mittels Pipette entnommen und 1,0 ml Aqua bidest. hinzugefügt. In diesen 3,0 ml Lösung wurde die PAH-Konzentration bestimmt.

#### **2.4.2 Medium (Filtrat)**

Das nach der Trennung von Medium und Gewebe gewonnene Filtrat wurde 10 Minuten bei ca. 4000 U/min zentrifugiert, um ein Absetzen der losgelösten Zellpartikel zu erreichen.

Vom Überstand wurden 0,5 ml mit einer Pipette abgenommen und als „Medium“ weiterverarbeitet. 0,5 ml Medium wurden mit 1,5 ml Aqua bidest. versetzt und mit 0,5 ml 20%iger Trichloressigsäure für 10 Minuten denaturiert, um gleiche Versuchsbedingungen wie bei der Aufarbeitung des Homogenats zu gewährleisten. Nach der Zentrifugation (4000 U/min, 10 min) wurden 2,0 ml Überstand entnommen, 1,0 ml Aqua bidest. dazugegeben und anschließend die PAH-Konzentration gemessen.

### **2.5 Eichkurve**

Zur Bestimmung der PAH-Konzentration im Schnitt und im Medium ist eine Eichkurve mit bekannten PAH-Konzentrationen erforderlich. Der aus der Eichkurve berechnete K-Wert (Quotient aus Extinktion der PAH Eichlösung und PAH-Konzentration des Ansatzes) dient als Divisor zur Ermittlung der PAH-Konzentration im Schnitt bzw. im Medium.

Zur Herstellung der Eichkurve (Verdünnungsreihe) wurde am Versuchstag eine 0,1%ige PAH-Stammlösung (100 mg PAH/100 ml Aqua bidest.) frisch angesetzt. 100 mg PAH wurden auf der Präzisionswaage (Sartorius Basic, MC 1 Laboratory LC 220 S, Sartorius AG, Göttingen, BRD) abgewogen. Daraus erfolgte die Herstellung einer PAH-Lösung im Verdünnungsverhältnis von 1:100. In den Konzentrationen 2,5; 5,0; 7,5 und 10 µg PAH/Ansatz wurden als Doppelmessreihen jeweils 2,0 ml Eichlösung mit 0,5 ml Trichloressigsäure versetzt und nach einer Einwirkzeit von 10 Minuten ein Überstand von 2,0 ml abgenommen. Nach Zugabe von 1,0 ml Aqua bidest. wurde die PAH-Konzentration bestimmt.

Zur Ermittlung der PAH-Konzentration im Inkubationsansatz, dem sogenannten Mediumbezugswert, wurden pro Experiment jeweils 3 Proben von je 3 ml Inkubationsmedium ohne Schnittgewebe in den Versuchsablauf einbezogen, um auch für den Bezugswert identische Versuchsbedingungen zu gewährleisten.

## **2.6 Bestimmungsmethoden**

### **2.6.1 Messung der PAH-Konzentration**

Dem Nachweis der p-Aminohippursäure (PAH) liegt die von BRATTON und MARSHALL (1939) entwickelte Methode zugrunde. Das Prinzip dieser Methode besteht in der Bildung von Diazoniumchlorid und der Kopplung der freien  $\text{NH}_2$ -Gruppe an N-Naphthyläthylendiamin unter Bildung eines colorimetrisch nachweisbaren Farbkomplexes.

Durch Diazotierung erfolgte der Nachweis der freien Aminogruppe am aromatischen Ring der p-Aminohippursäure. Dazu sind die Proben mit 0,1 ml Natriumnitritlösung ( $\text{NaNO}_2$ , Laborchemie Apolda, BRD) versetzt worden, wodurch sich das Diazoniumsalz bildete.

Nach einer Einwirkungszeit von 5 Minuten wurde das überschüssige Nitrit durch 0,1 ml 5 %ige Amidosulfonsäure (SOJUZCHIMEXPORT, UdSSR) gebunden. Das Diazoniumsalz wurde nach weiteren 5 Minuten mit 0,1 ml 0,1%iger N-(-1-Naphthyl)-Äthylendiamindichloridlösung (BRATTON-MARSHALL-Reagenz, Fa. Merck, Darmstadt, BRD) zu einem stabilen Azofarbstoff gekoppelt.

Die Herstellung der Natriumnitritlösung erfolgte jeweils am Versuchstag. Es wurden 200 mg Natriumnitrit auf der Sartorius-Präzisionswaage abgewogen und mit 20 ml Aqua bidest. zu einer 1%igen Lösung angesetzt. 2,5 g Amidosulfonsäure wurden in 50 ml Aqua bidest. gelöst und eine 5%ige Lösung hergestellt. Diese war bei ca.  $4^\circ\text{--}7^\circ\text{C}$  für ungefähr 2 Wochen haltbar. Das Farbreagenz nach BRATTON-MARSHALL, hergestellt aus 100 mg N-(-1-Naphthyl)-Äthylendiamindichloridlösung auf 100 ml Aqua bidest., war in einer dunklen Flasche für ca. 4 Wochen bei  $5^\circ\text{C}$  haltbar.

Die Intensität des Farbstoffkomplexes erreicht nach 50 Minuten ihr Maximum und ist der PAH-Konzentration proportional. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Extinktionsmes-

sung mit dem Spektralfotometer Spekol 1100 (Carl Zeiss, Jena, BRD) bei einer Wellenlänge des Lichtes von 545 nm gegen einen PAH-freien Leerwert.

Die Akkumulationsfähigkeit des Nierengewebes für PAH wurde als Schnitt-Medium-Quotient ( $Q_{S/M}$ ) wie folgt berechnet:

$$Q_{S/M} = \frac{\mu\text{g PAH} / \text{g Schnitt}}{\mu\text{g PAH} / \text{ml Inkubation slösung}} \quad (1)$$

Zur Kontrolle bzw. in Fällen, in denen die Konzentration im Schnitt aus versuchstechnischen Gründen fehlte, ließ sich der  $Q_{S/M}$ -Wert auch indirekt ermitteln, indem der Quotient aus der berechneten Konzentration im Schnitt und PAH-Konzentration in 1 ml Medium gebildet wurde:

$$Q_{S/M, \text{berechnet}} = \frac{c_{\text{Schnitt, berechnet}}}{c_{\text{PAH} / 1\text{ml Medium}}} \quad (2)$$

$$c_{\text{Schnitt, berechnet}} = \frac{\text{PAH Menge in 3ml MBW} - 3 * c_{\text{PAH} / 1\text{ml Medium}}}{\text{Schnittgewicht}} \quad (3)$$

MBW: Mediumbezugswert (PAH-Konzentration im Medium ohne Gewebezusatz)

$c_{\text{Schnitt, berechnet}}$ : Berechnete PAH-Konzentration im Schnitt nach Inkubation

$c_{\text{PAH} / 1\text{ml Medium}}$ : PAH-Konzentration in 1 ml Medium nach Inkubation

Die Wiederfindungsrate gibt die Summe der PAH-Menge in Medium und Schnitt nach Beendigung der Inkubation bezogen auf 3 ml Lösung an. Sie wird errechnet aus:

$$WFR[\%] = \frac{3 * c_{\text{PAH} / 1\text{ml Medium}} + c_{\text{PAH} / 1\text{mg Schnitt}} * m_{\text{Schnitt nach Inkubation}}}{MBW} * 100\% \quad (4)$$

WFR: Wiederfindungsrate

$c_{\text{PAH} / 1\text{ml Medium}}$ : PAH-Konzentration in 1 ml Medium nach der Inkubation

$c_{\text{PAH} / 1\text{mg Schnitt}}$ : PAH-Konzentration in 1 mg Schnittgewebe

$m_{\text{Schnitt nach Inkubation}}$ : Schnittgewicht nach der Inkubation [mg]

## **2.6.2 Glutathionbestimmung**

Zur Bestimmung von reduziertem (GSH) und oxidiertem (GSSG) Glutathion wurden Gewebeprobe(n) (ca. 100 mg Niere) mit 1,1 ml eisgekühltem Puffer (200 mmol Na-Phosphat/ 1,5 mmol EDTA/ l; pH 8,0) und 0,4 ml 25%iger Metaphosphorsäure homogenisiert. Das denaturierte Homogenat wurde 30 Minuten bei 0°C mit 16000 U/min zentrifugiert (Zentrifuge K24, MLW Engelsdorf, BRD). Der Überstand wurde zur Bestimmung von GSH und GSSG verwendet. Alle verwendeten und nicht näher deklarierten Chemikalien wurden von der Firma Sigma (Deisenhofen, BRD) bezogen.

### **2.6.2.1 GSH**

Die Bestimmung des reduzierten Glutathions erfolgte nach der modifizierten ELLMANN-Methode (KRETZSCHMAR et al., 1989). Diese ist eine kolorimetrische Bestimmungsmethode, bei der 5,5 - Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) mit freien SH-Gruppen reagiert, wobei es zur Gelbfärbung kommt. Die Farbreaktion ist proportional zur Menge der freien SH-Gruppen. 0,2 ml des Überstandes wurden mit 1,6 ml Puffer (200 mmol Na-Phosphat/1,5 mmol EDTA/l; pH 0,8) und 0,2 ml 10 mmol 5,5 - Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)/l (Serva, Heidelberg, BRD) versetzt. Die Absorption wurde bei 412 nm am Spektralkolorimeter Spekol 1100 (Carl Zeiss, Jena, BRD) gegen einen Leerwert gemessen. Für den Leerwert wurde anstelle des Homogenats Wasser eingesetzt.

### **2.6.2.2 GSSG**

Die Bestimmung des oxidierten Glutathions erfolgte nach der Methode von HISSIN und HILF (1976). Diese Methode beruht darauf, dass Orthophthalaldehyd (OPA) bei einem basischen pH-Wert mit GSSG einen fluoreszierenden Komplex bildet. Da auch GSH mit OPA einen fluoreszierenden Komplex bilden würde, wird dem Überstand zuerst N-Ethylmaleimid (NEM) zugegeben, welches seinerseits mit GSH einen Komplex bildet. Zu 0,5 ml des Überstandes wurden 0,2 ml 100 mmol NEM/l (Serva, Heidelberg, BRD) gegeben. Nach 20-minütiger Einwirkung bei Raumtemperatur wurden 2,3 ml 0,1 N NaOH zugesetzt. Von diesem Gemisch wurden 0,5 ml abgenommen, mit 0,2 ml OPA (Serva, Heidelberg, BRD) versetzt und danach mit 0,1 N NaOH auf 3,0 ml aufgefüllt. Nach 15 Minuten wurde die Fluoreszenz im Spektrofluorimeter (Fa. Shimadzu, Kioto, Japan) bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm und einer Messwellenlänge von

430 nm gemessen. Es wurden ein Leerwert sowie Eichwerte mit bekannten GSSG-Konzentrationen (Serva, Heidelberg, BRD) mitgeführt.

### **2.6.3 Kaliumbestimmung**

Die Bestimmung von Kalium erfolgte nach einer direkten Methode mit einem Flammenphotometer (Modell III, Carl Zeiss, Jena, BRD). Um in einem optimalen Konzentrationsbereich messen zu können, wurden Verdünnungen von 1:20 bis 1:500 hergestellt. Von der eigentlichen Bestimmung der Kalium-Konzentrationen in den Proben erfolgte die Messung von Kalium-Eichwerten, mit deren Hilfe im Anschluss an die Messungen die Konzentration an Kalium im Nierengewebe ermittelt werden konnte (BRÄUNLICH und KERSTEN, 1972).

## **2.7 Statistische Bearbeitung und Auswertung der Ergebnisse**

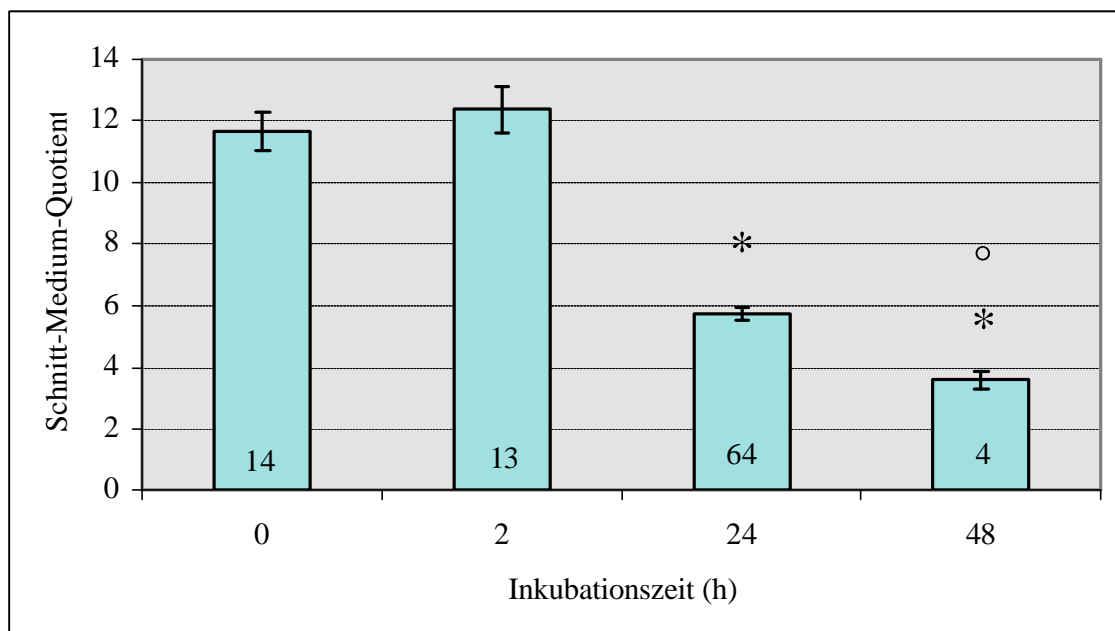
Bei den Versuchen an Nierenrindenschnitten der Ratte wurden pro Versuchsansatz 3-4 Proben untersucht, bei denen das Gewebe von jeweils einer Ratte verwendet wurde. Von jedem Patienten wurden in Abhängigkeit von der Gewebemenge 10-30 einzelne Schnitte angefertigt. Die Ergebnisse von durchschnittlich 3 Proben eines Patienten je Versuchsansatz wurden arithmetisch gemittelt und mit Standardfehler angegeben. Bei zu geringer Gewebemenge musste die Anzahl der Proben bei einigen Untersuchungsreihen reduziert werden. Somit konnten pro Patient die Auswirkungen mehrerer Konzentrationen von Dexamethason bzw. Triiodthyronin gleichzeitig mit Kontrollwerten verglichen werden. Aufgrund dessen erfolgte die Prüfung auf signifikante Unterschiede mittels des ungepaarten  $t$ -Tests nach STUDENT. Der Berechnung wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % zugrunde gelegt ( $p \leq 0,05$ ).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 PAH-Akkumulation in intaktem Nierengewebe der Ratte

#### 3.1.1 Abhängigkeit der PAH-Akkumulation von der Inkubationszeit

In Vorversuchen wurde an Nierengewebe der Ratte das methodische Vorgehen optimiert. Die **Abbildung 3** zeigt die PAH-Akkumulation in Nierenrindenschnitten erwachsener Ratten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.



**Abbildung 3**

PAH-Akkumulation (Schnitt-Medium-Quotient) in Nierenrindenschnitten von Ratten in Cross-Taggart-Medium (Akutversuch = 0 Stunden) bzw. nach 2, 24 und 48 Stunden Inkubation in Williams E-Medium und anschließender 2-stündiger Messung der PAH-Aufnahme in Cross-Taggart-Medium.

Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler;

Zahlen in den Säulen = Anzahl der Messungen;

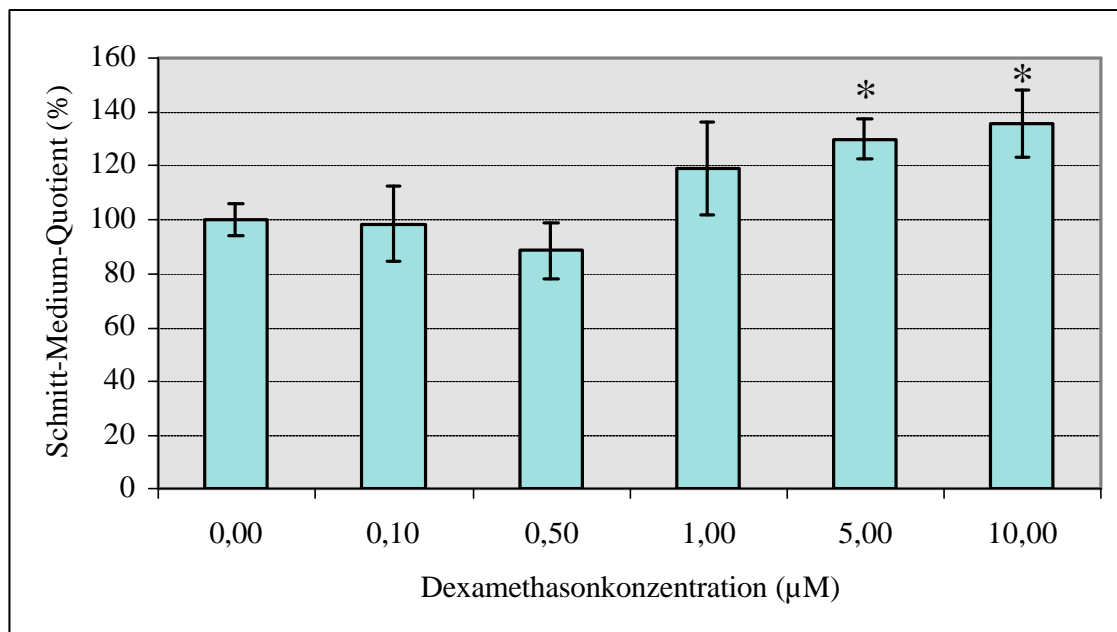
\* = signifikanter Unterschied zum Akutversuch ( $p \leq 0,05$ );

° = signifikanter Unterschied zur Inkubationszeit 24 Stunden ( $p \leq 0,05$ )

Die Nierenrindenschnitte wurden 2, 24 bzw. 48 Stunden in Williams E-Medium inkubiert und mit Carbogen begast. Anschließend erfolgte die Messung der PAH-Akkumulation während eines zweistündigen Versuches in Cross-Taggart-Medium unter

Sauerstoffbegasung. Mit zunehmender Inkubationsdauer kommt es zwar zu einer signifikanten Abnahme der PAH-Akkumulationsfähigkeit (d.h. einen reduzierten Schnitt-Medium-Quotienten), die PAH-Anreicherung ist jedoch auch nach 24-stündiger Inkubation in Williams E-Medium deutlich nachweisbar ( $Q_{S/M} = 5,76 \pm 0,21$ ). Trotz der Halbierung der PAH-Akkumulationskapazität kann man auch nach 24 Stunden von einer aktiven Akkumulation ausgehen, d.h. die PAH-Anreicherung im Nierenrindenschnitt erreicht Werte wesentlich oberhalb des Äquilibrium ( $Q_{S/M} = 1$ ). Nach 48 Stunden geht die PAH-Akkumulation weiter zurück, dennoch kann auch zu diesem Zeitpunkt von der Funktionstüchtigkeit des Nierengewebes ausgegangen werden, da der Schnitt-Medium-Quotient ( $Q_{S/M} = 3,59 \pm 0,30$ ) immer noch deutlich über 1 liegt.

Für die weiteren Untersuchungen wurden neben den Akut- und 2 Stundenversuchen vor allem 24 Stundenversuche vorgenommen, um den Einfluss von Dexamethason und Triiodthyronin näher zu charakterisieren.



**Abbildung 4**

Einfluss von Dexamethason auf die PAH-Akkumulation (Schnitt-Medium-Quotient in %) in Nierenrindenschnitten von Ratten nach 2 Stunden Inkubation in Dexamethason-haltigem Williams E-Medium und anschließender 2-stündiger Messung der PAH-Aufnahme in Cross-Taggart-Medium.

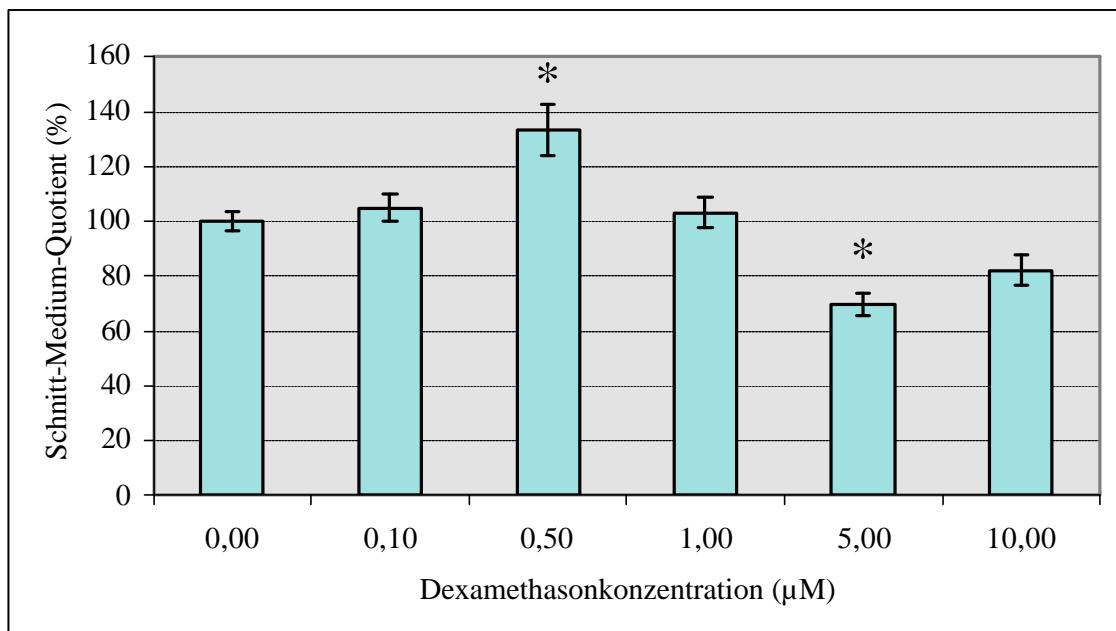
Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, n = 6-8 Messungen pro Konzentration;

\* = signifikanter Dexamethasoneffekt ( $p \leq 0,05$ )

### 3.1.2 Einfluss von Dexamethason und Triiodthyronin auf die PAH-Akkumulation

In **Abbildung 4** ist der Einfluss von Dexamethason auf die PAH-Akkumulation in Nierenrindenschnitten erwachsener Ratten nach 2 Stunden Inkubation dargestellt.

Es wurde die Relativedarstellung gewählt, um die Ergebnisse auf einen normierten Kontrollwert (100 %) beziehen zu können, da nicht alle Versuche gleichzeitig durchgeführt werden konnten. Bei der Ratte hat Dexamethason überraschenderweise bereits nach zweistündiger Einwirkungszeit einen signifikanten Einfluss auf die PAH-Akkumulation, die um ca. 30% bei relativ **hohen** Dexamethasonkonzentrationen von 5 und 10  $\mu\text{M}$  zunimmt.



**Abbildung 5**

Einfluss von Dexamethason auf die PAH-Akkumulation (Schnitt-Medium-Quotient in %) in Nierenrindenschnitten von Ratten nach 24 Stunden Inkubation in Dexamethasonhaltigem Williams E-Medium und anschließender 2-stündiger Messung der PAH-Aufnahme in Cross-Taggart-Medium.

Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n = 12-24$  Messungen pro Konzentration;

\* = signifikanter Dexamethasoneffekt ( $p \leq 0,05$ )

Den Einfluss einer 24-stündigen Inkubation mit Dexamethason auf die PAH-Akkumulation in Nierenrindenschnitten erwachsener Ratten zeigt **Abbildung 5**. Die Relativwerte beziehen sich hier auf Inkubationsversuche ohne Dexamethasonzusatz (=100%). Bei einer vergleichsweise **niedrigen** Dexamethasonkonzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  erreicht die PAH-Aufnahmekapazität ein Maximum und nimmt nach Inkubation mit

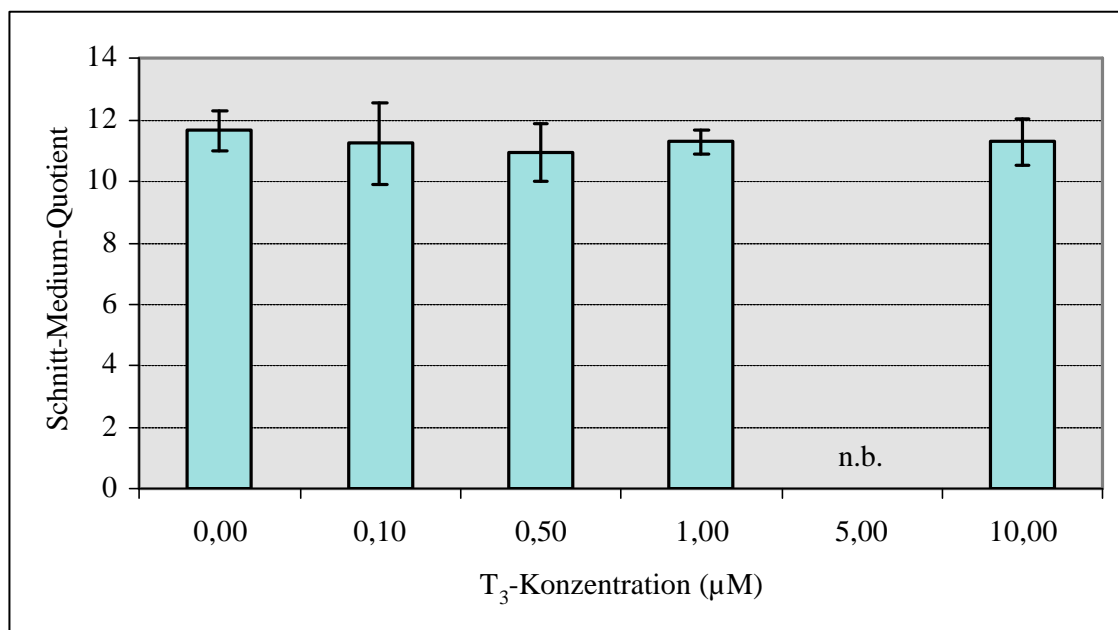


höheren Konzentrationen wieder ab. Gegenüber den Kontrollwerten konnte eine maximale Steigerung der  $Q_{S/M}$ -Werte von 33% festgestellt werden.

Nach 48 Stunden Inkubation in Dexamethason-haltigem Williams E-Medium lagen die Schnitt-Medium-Quotienten im Kontrollbereich, so dass zu diesem Zeitpunkt für Dexamethason kein Stimulationseffekt nachgewiesen werden konnte (Befunde nicht dargestellt).

In **Abbildung 6** und **Abbildung 7** wird der Einfluss von Triiodthyronin auf die PAH-Akkumulation in Nierenrindenschnitten erwachsener Ratten im 2- und 24-Stunden-Versuch gezeigt. Da beide Versuchsreihen jeweils nur auf einen Kontrollwert bezogen wurden, sind die absoluten  $Q_{S/M}$ -Werte wiedergegeben. Triiodthyronin führte nach 2 Stunden Einwirkungszeit zu keiner Veränderung der PAH-Aufnahme.

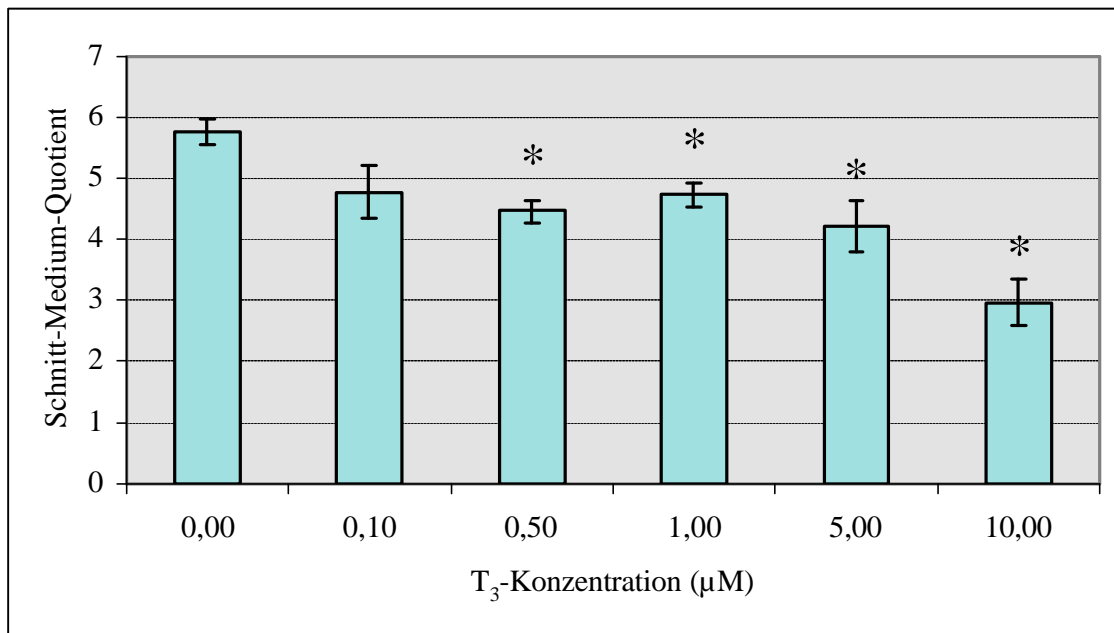
Im 24-Stunden-Versuch (**Abbildung 7**) kommt es unter  $T_3$ -Einfluss zu einer signifikanten, konzentrationsabhängigen Abnahme der PAH-Akkumulationsfähigkeit um ca. 50 %. Somit verringert Triiodthyronin im Gegensatz zum Dexamethason die PAH-Akkumulation im Nierengewebe der Ratte und ist offensichtlich nicht zur Stimulation der PAH-Akkumulation in Nierenrindenschnitten geeignet.



**Abbildung 6**

Einfluss von Triiodthyronin auf die PAH-Akkumulation (Schnitt-Medium-Quotient) in Nierenrindenschnitten von Ratten nach 2 Stunden Inkubation in  $T_3$ -haltigem Williams E-Medium und anschließender 2-stündiger Messung der PAH-Aufnahme in Cross-Taggart-Medium.

Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n = 4$  Messungen pro Konzentration; (n.b. = nicht bestimmt)



#### Abbildung 7

Einfluss von Triiodthyronin auf die PAH-Akkumulation (Schnitt-Medium-Quotient) in Nierenrindenschnitten von Ratten nach 24 Stunden Inkubation in T<sub>3</sub>-haltigem Williams E-Medium und anschließender 2-stündiger Messung der PAH-Aufnahme in Cross-Taggart-Medium.

Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, n = 9-12 Messungen pro Konzentration;

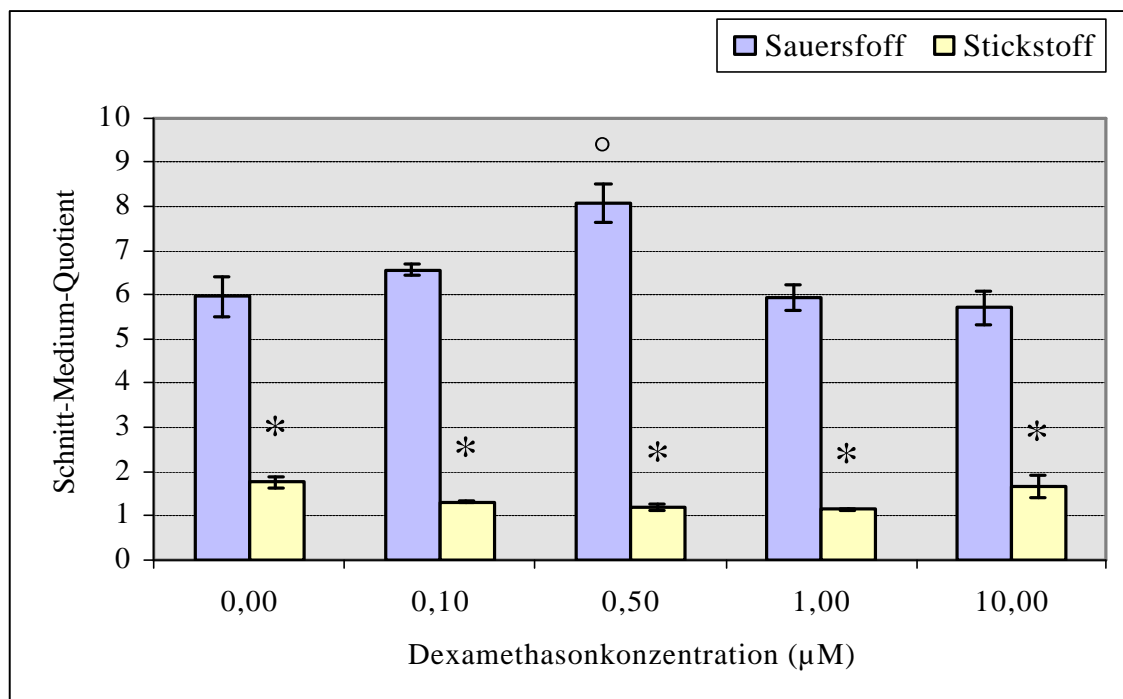
\* = signifikanter Unterschied zum Kontrollwert (T<sub>3</sub>-Konz.= 0,00), ( $p \leq 0,05$ )

Nachdem sich gezeigt hatte, dass bei der Ratte lediglich Dexamethason eine Steigerung der renalen PAH-Akkumulation hervorruft, wurde der Dexamethasoneinfluss auf das Nierengewebe näher charakterisiert. Es wurden die Auswirkungen der Dexamethasonvorbehandlung auf die Energiebereitstellung, auf den oxydativen Status und den Kaliumhaushalt der Nierenrindenzellen der Ratte untersucht.

### 3.1.3 Abhängigkeit der Stimulation der PAH-Akkumulation von der Energiebereitstellung

In der **Abbildung 8** ist die PAH-Akkumulation in Nierenrindenschnitten für Ratten sowohl unter Sauerstoff- als auch unter Stickstoffbegasung während der 2-stündigen Messung der PAH-Aufnahme dargestellt. Dieser Versuchsansatz sollte zeigen, inwieweit durch Dexamethason die unspezifische Bindung von PAH in der Nierenzelle beeinflusst wird und ob der Stimulationsseffekt tatsächlich auf Veränderungen aktiver, energieab-

hängiger, O<sub>2</sub>-verbrauchender Prozesse beruht. Die Inkubation mit Dexamethason erfolgte zuvor über 24 Stunden unter Carbogenbegasung in Williams E-Medium. Unter Stickstoffbegasung liegen die Schnitt-Medium-Quotienten um 1, d.h. weder eine aktive Aufnahme noch ein vermehrter passiver influx von PAH sind nachweisbar. Dagegen zeigt die PAH-Akkumulation unter Sauerstoffbegasung die bereits in **Abbildung 5** dargestellte Konzentrationsabhängigkeit, wiederum mit einem Maximum bei einer Dexamethasonkonzentration von 0,50 µM, so dass die in **Abbildung 5** erhobenen Befunde in diesem Versuchsansatz bestätigt werden konnten.



**Abbildung 8**

Einfluss von Stickstoff auf die PAH-Akkumulation (Schnitt-Medium-Quotient) in Nierenrindenschnitten von Ratten nach 24 Stunden Inkubation unter Carbogenbegasung mit Dexamethason-haltigem Williams E-Medium und anschließender 2-stündiger Messung der PAH-Aufnahme.

Arithmetische Mittelwerte ± Standardfehler, n = 4 Messungen pro Gruppe;

\* = signifikanter Unterschied zur Sauerstoffbegasung ( $p \leq 0,05$ );

° = signifikanter Einfluss von Dexamethason ( $p \leq 0,05$ )

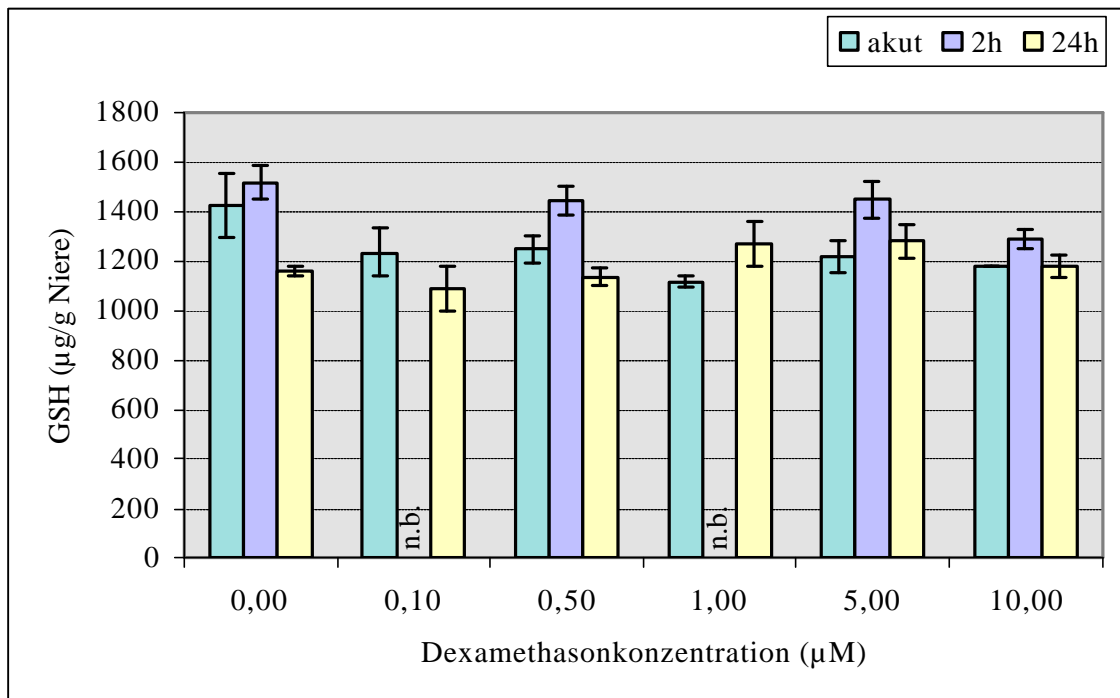
In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Inkubationsmedien Williams E und Via Span (siehe Methode) verglichen. Beide Medien enthielten Dexamethason zur Stimulation der PAH-Akkumulation in Nierenrindenschnitten. Die Schnitt-Medium-Quotienten erreichten bei den Versuchen, in denen Dexamethason in Via Span Medium enthalten war, nur Werte zwischen 1 und 1,5, so dass Via Span als Inkubationsmedium für die Bearbeitung unserer Fragestellung sich als nicht geeignet erwies (Befunde nicht dargestellt).

### **3.1.4 Bestimmung der Konzentration von $K^+$ , GSH und GSSG zur Charakterisierung der Funktionsfähigkeit der Zelle**

Die folgenden 3 Abbildungen sollen die Funktionsfähigkeit der Nierenrindenschnitte nach 24-stündiger Inkubation und die Auswirkung einer Vorbehandlung mit Dexamethason auf den Zustand der Nierenrindenschnitte belegen. Als Parameter wurden die Konzentrationen von GSH, GSSG und Kalium im Nierengewebe gemessen.

In **Abbildung 9** ist die Konzentration des reduzierten Glutathions (GSH) in Nierenrindenschnitten von Ratten unter Einfluss von Dexamethason dargestellt. Unter allen Versuchsbedingungen schwanken die Werte lediglich zwischen 1200 und 1400  $\mu\text{g/g}$  Niere. Die Konzentration des GSH konnte somit unabhängig von der Inkubationszeit und der Dexamethasonkonzentration praktisch unverändert nachgewiesen werden, was ein Kriterium für die Intaktheit der Zellfunktionen, speziell des Redoxstatus der Zellen, ist.

Andererseits muss festgestellt werden, dass Dexamethason offensichtlich nicht zu einer generellen Verbesserung des Zustandes der Nierenzellen führt, so dass die gemessenen Auswirkungen der Dexamethasonvorbehandlung auf die PAH-Akkumulation eher spezifische Effekte auf der Transporterebene darstellen.



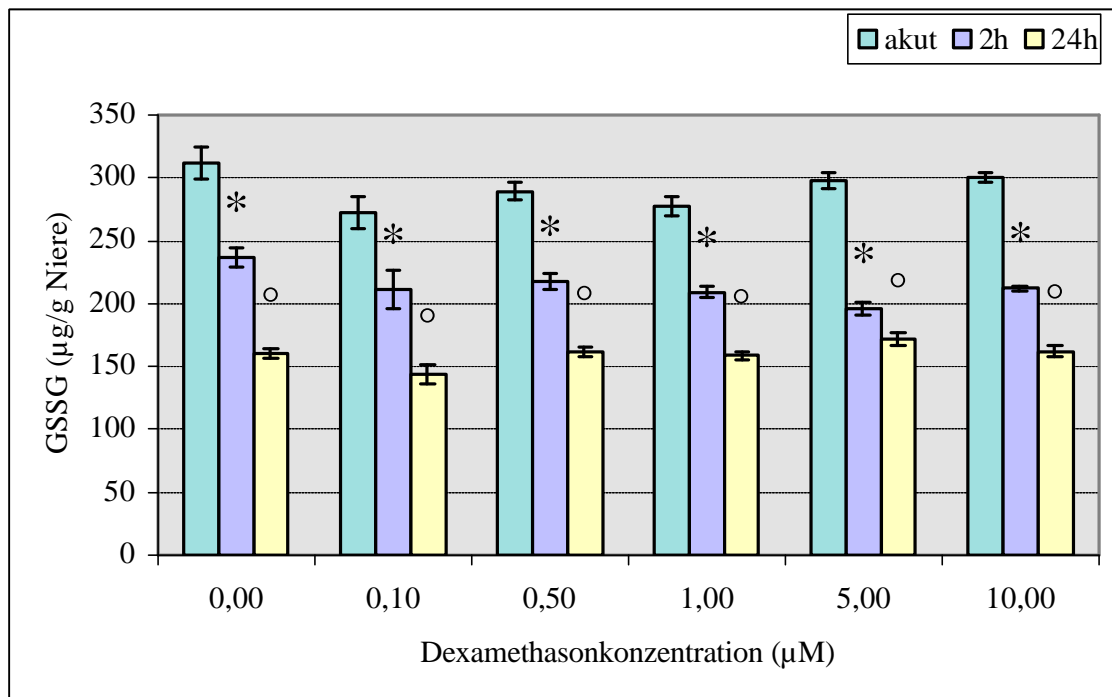
**Abbildung 9**

GSH-Konzentration in Nierenrindenschnitten von Ratten unter Einfluss von Dexamethason und in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (akut, 2 und 24 Stunden).

Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n = 3-4$  Messungen pro Gruppe;

(n.b. = nicht bestimmt)

Die **Abbildung 10** zeigt die Konzentration von oxidiertem Glutathion (GSSG) in Nierenrindenschnitten von Ratten unter Einfluss von Dexamethason in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Eine zeitabhängige, signifikante Abnahme der GSSG-Konzentration nach 2- und 24-stündiger Inkubation wird deutlich (siehe Dexamethasonkonzentration 0,00 µM). Dagegen konnte keine signifikante Beeinflussung der GSSG-Konzentration in den Nierenzellen der Ratte durch Dexamethason nachgewiesen werden. Auch dieser Befund spricht für eine spezifische Wirkung von Dexamethason auf den PAH-Transport, da die allgemeinen Zellfunktionen, in diesem Fall das Redoxpotential, unbeeinflusst zu bleiben scheinen.



**Abbildung 10**

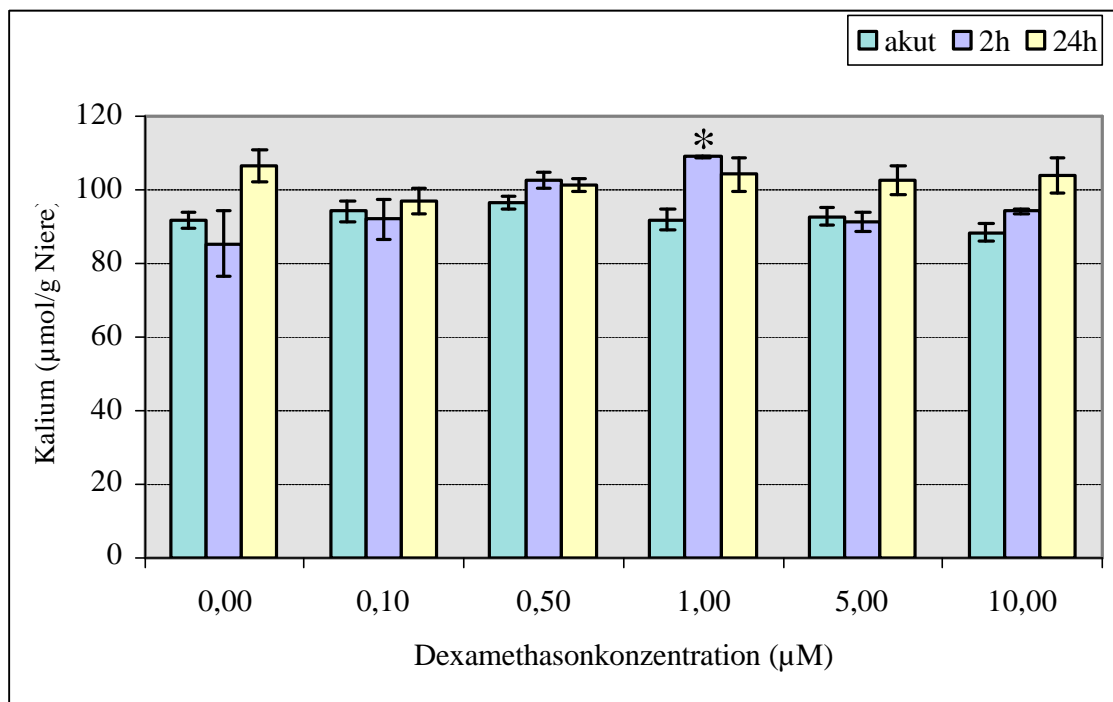
GSSG-Konzentration in Nierenrindenschnitten von Ratten unter Einfluss von Dexamethason und in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (akut, 2 und 24 Stunden).

Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, n = 3-4 Messungen pro Gruppe;

\* = signifikanter Unterschied zu den zugehörigen Akutversuchen ( $p \leq 0,05$ );

° = signifikanter Unterschied zu den jeweiligen Akut- und 2-Stunden-Versuchen ( $p \leq 0,05$ )

In der **Abbildung 11** ist die Kaliumkonzentration als Marker der Zellintegrität in Nierenrindenschnitten von Ratten unter Einfluss von Dexamethason in Abhängigkeit von der Inkubationszeit wiedergegeben. Trotz 24-stündiger Inkubation schwanken die Werte lediglich zwischen 90 und 100  $\mu\text{mol/g}$  Niere, was für einen nahezu konstanten Kaliumgehalt unter allen Versuchsbedingung spricht. Das bedeutet zum einen, dass das Nierengewebe auch nach 24-stündiger Inkubation voll funktionstüchtig ist, da Kalium an der Aufrechterhaltung des zellulären Ruhepotentials und des osmotischen Drucks in der Zelle beteiligt ist (MACRI et al., 1997). Zum anderen stützen auch diese Befunde die Hypothese, dass der Dexamethasonwirkung auf den PAH-Transport spezifische Mechanismen zugrunde liegen, die durch die geringfügige, nur in einem Fall, signifikante Zunahme der Kaliumkonzentration in den Intrazellulärraum sicherlich nicht zu erklären sind.



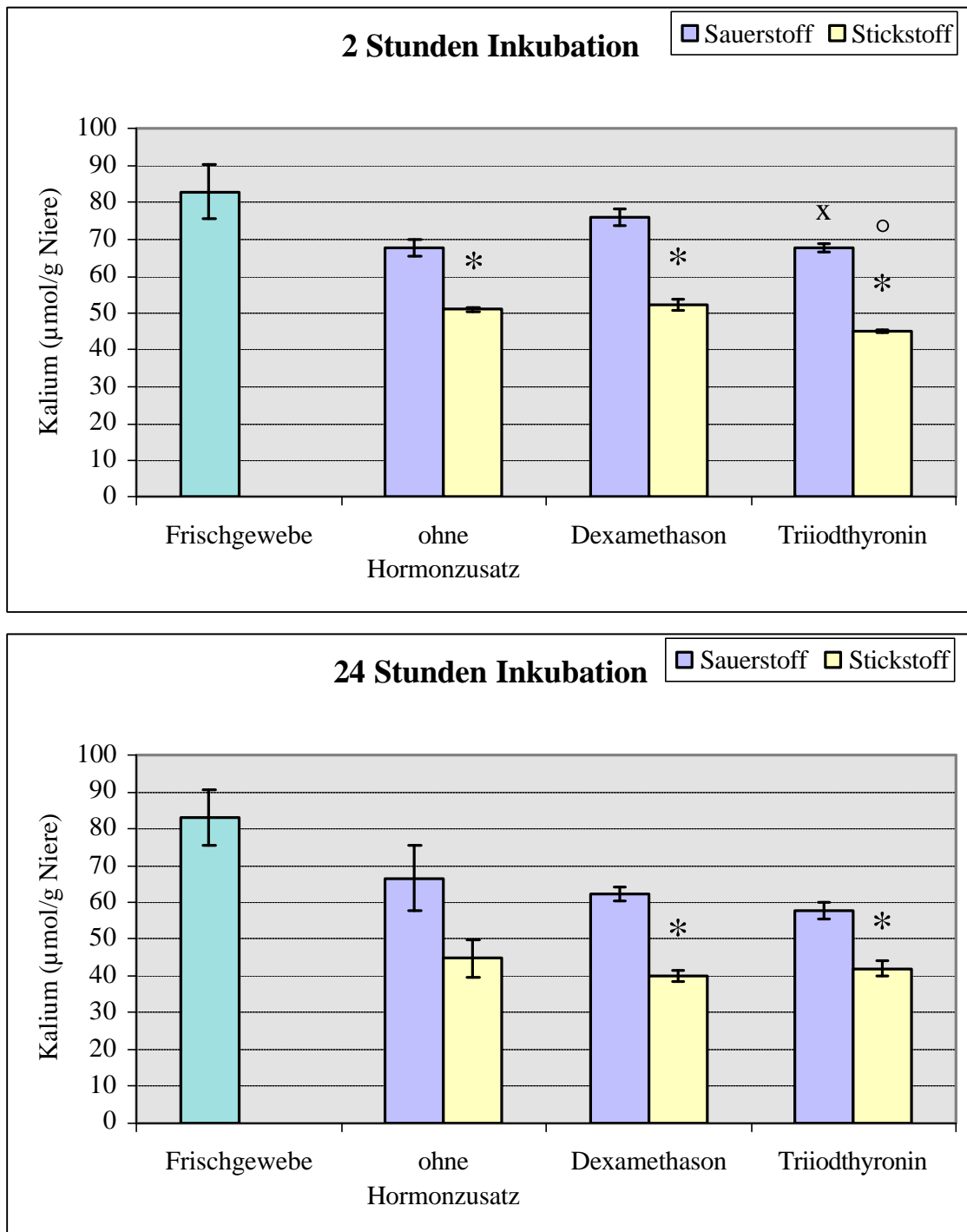
**Abbildung 11**

Kaliumkonzentration in Nierenrindenschnitten von Ratten unter Einfluss von Dexamethason und in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (akut, 2 und 24 Stunden).

Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n = 3-4$  Messungen pro Gruppe;

\* = signifikanter Unterschied zum zugehörigen Kontrollwert (Dexa.-Konz.= 0,00 µM), ( $p \leq 0,05$ )

**Abbildung 12** zeigt die Kaliumkonzentration während einer 2-stündigen Begasung mit Sauerstoff bzw. Stickstoff in Nierenrindenschnitte von Ratten nach 2 bzw. 24 Stunden Inkubation in Dexamethason- bzw.  $T_3$ -haltigen Williams E-Medium. Erwartungsgemäß nimmt die Kaliumkonzentration unter Stickstoffbegasung signifikant ab, unabhängig von der Art der zuvor durchgeführten Inkubation. Auch unter Sauerstoffbegasung geht die Kaliumkonzentrationen im Vergleich zum Frischgewebe nach 24-stündiger Inkubation geringfügig, allerdings nicht signifikant zurück. Nach 24-stündiger Inkubation haben weder Dexamethason noch  $T_3$  einen signifikanten Einfluss auf die Kaliumkonzentration der Nierenrindenschnitte, so dass sich bestätigt, dass die Auswirkungen der Hormone auf die PAH-Transportleistung der Nierenzellen der Ratte nicht durch eine Veränderung der intrazellulären Kaliumkonzentration erklärt werden können.



**Abbildung 12**

Einfluss einer Begasung der Nierenrindenschnitte von Ratten mit Sauerstoff bzw. Stickstoff auf die Kaliumkonzentration nach **2** (oben) bzw. **24** (unten) Stunden Inkubation in Williams E-Medium in Anwesenheit von Dexamethason (1 µM) bzw. Triiodthyronin (1 µM) und anschließender PAH-Akkumulation in Cross-Taggart-Medium.

Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, n = 3 Messungen pro Gruppe;

\* = signifikanter Unterschied zur Sauerstoffbegasung ( $p \leq 0,05$ );

° = signifikanter  $T_3$ -Einfluss ( $p \leq 0,05$ );

x = signifikanter Unterschied zur Sauerstoffbegasung mit Dexamethason ( $p \leq 0,05$ )



## 3.2 PAH-Akkumulation in intaktem Nierengewebe und Nierenzellkarzinomgewebe des Menschen

Das Hauptziel der vorliegenden Untersuchung bestand darin nachzuweisen, ob der PAH-Transport auch in menschlichem Nierenzellkarzinomgewebe durch Hormonbehandlung mit Dexamethason bzw. Triiodthyronin beeinflusst werden kann.

In Vorversuchen an der Ratte (s. 3.1) ließen sich die Ergebnisse früherer Untersuchungen (FLECK et al., 1997a, 1998) reproduzieren und validieren, so dass der Versuchsansatz für die Untersuchungen menschlichen Nierengewebes optimiert werden konnte.

### 3.2.1 Akutversuche – 2-stündige Inkubation von menschlichem Nierenzellkarzinomgewebe in PAH-haltigem Cross-Taggart-Medium

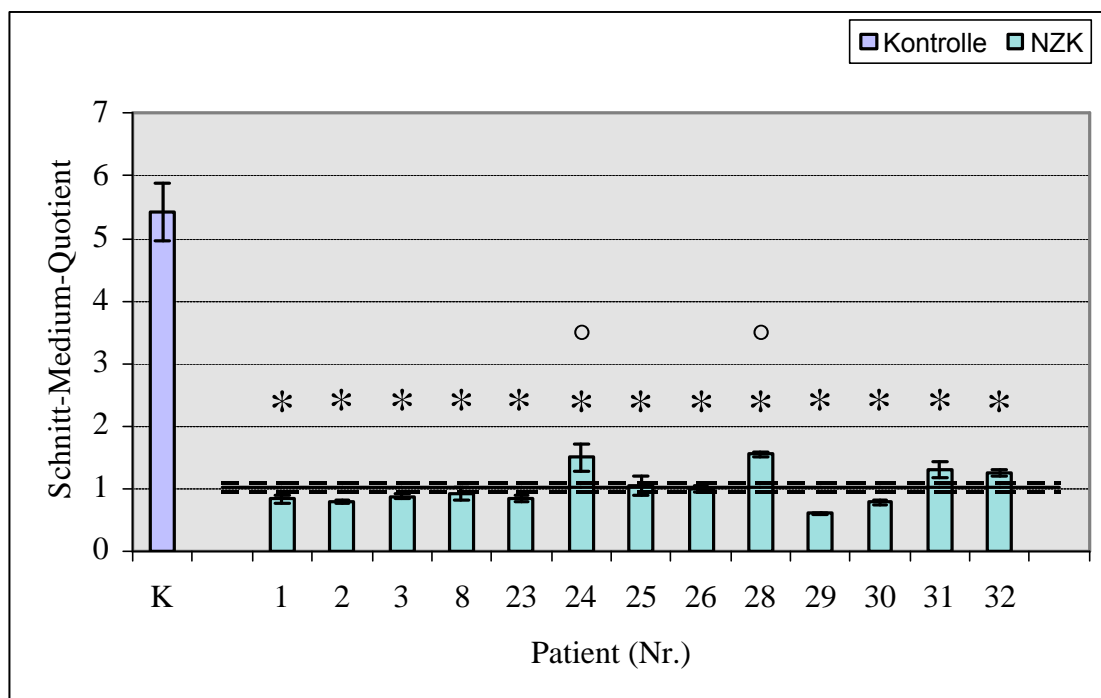
Wie zu erwarten war, entsprach die gesamte PAH-Menge im Gewebe und im Medium nach 2-stündiger und auch nach 24-stündiger Inkubation bei allen Versuchsansätzen (Kontrollen, Dexamethason, T<sub>3</sub>) annähernd der eingesetzten Ausgangsmenge im Medium (Wiederfindungsrate  $\approx 100\%$ , s. **Tabelle 5**). Geringe Abweichungen sind durch individuelle Fehler während des Versuchsablaufes, z.B. beim Wiegen der Schnitte, Fehler beim Homogenisieren der Proben usw. zu erklären.

**Tabelle 5:** Wiederfindungsraten (%) für PAH nach 2- bzw. 24-stündiger Inkubation unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss von Dexamethason bzw. Triiodthyronin in NZK-Gewebe. Arithmetischer Mittelwert  $\pm$  Standardfehler; Anzahl der Messungen in Klammern

Inkubationsdauer	Kontrolle	Dexamethason	Triiodthyronin
2 h	98 $\pm$ 2 (4)	99 $\pm$ 1 (3)	91 $\pm$ 5 (3)
24 h	96 $\pm$ 2 (16)	94 $\pm$ 3 (13)	101 $\pm$ 2 (3)

Nach 2-stündiger Inkubation wurde PAH in makroskopisch gesundem Gewebe (Kontrolle), das den tumorbefallenen Nieren entnommen wurde, angereichert, so dass die PAH-Konzentration in den Nierenrindenschnitten um den Faktor 5 höher lag als im Medium (Kontrollwert in **Abbildung 13**).

In den Vorversuchen (s. 3.1) an Nierenrindenschnitten der Ratte wurde PAH im Schnitt um den Faktor 12 im Vergleich zur Mediumkonzentration angereichert. D.h., die Akkumulationsfähigkeit des frischen Gewebes der Ratte ist etwa 2,5 mal höher als die des gesunden menschlichen Nierengewebes von älteren Erwachsenen. Neben Speziesdifferenzen und Altersunterschieden sind dafür die auch unter 3.2.5 aufgeführten unterschiedlichen Versuchsbedingungen verantwortlich, die mit einer deutlich längeren warmen Ischämiezeit des menschlichen Nierengewebes einhergingen. Andererseits ist die Akkumulationskapazität für PAH in Nierenzellkarzinomgewebe vollständig aufgehoben ( $Q_{S/M} \leq 1$ ), (**Abbildung 13**). Lediglich bei den Patienten Nr. 24 und 28 konnte eine geringfügige PAH-Anreicherung im Gewebe nachgewiesen werden ( $Q_{S/M} \approx 1,5$ ).



**Abbildung 13**

PAH-Akkumulation (Schnitt-Medium-Quotient, Akutversuch in PAH-haltigem Cross-Taggart-Medium) in Nierenzellkarzinomgewebe (NZK) von 13 Patienten im Vergleich zu gesundem menschlichem Nierengewebe (K).

Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n = 3-4$  Messungen pro Patient

\* = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (K: 6 Patienten), ( $p \leq 0,05$ );

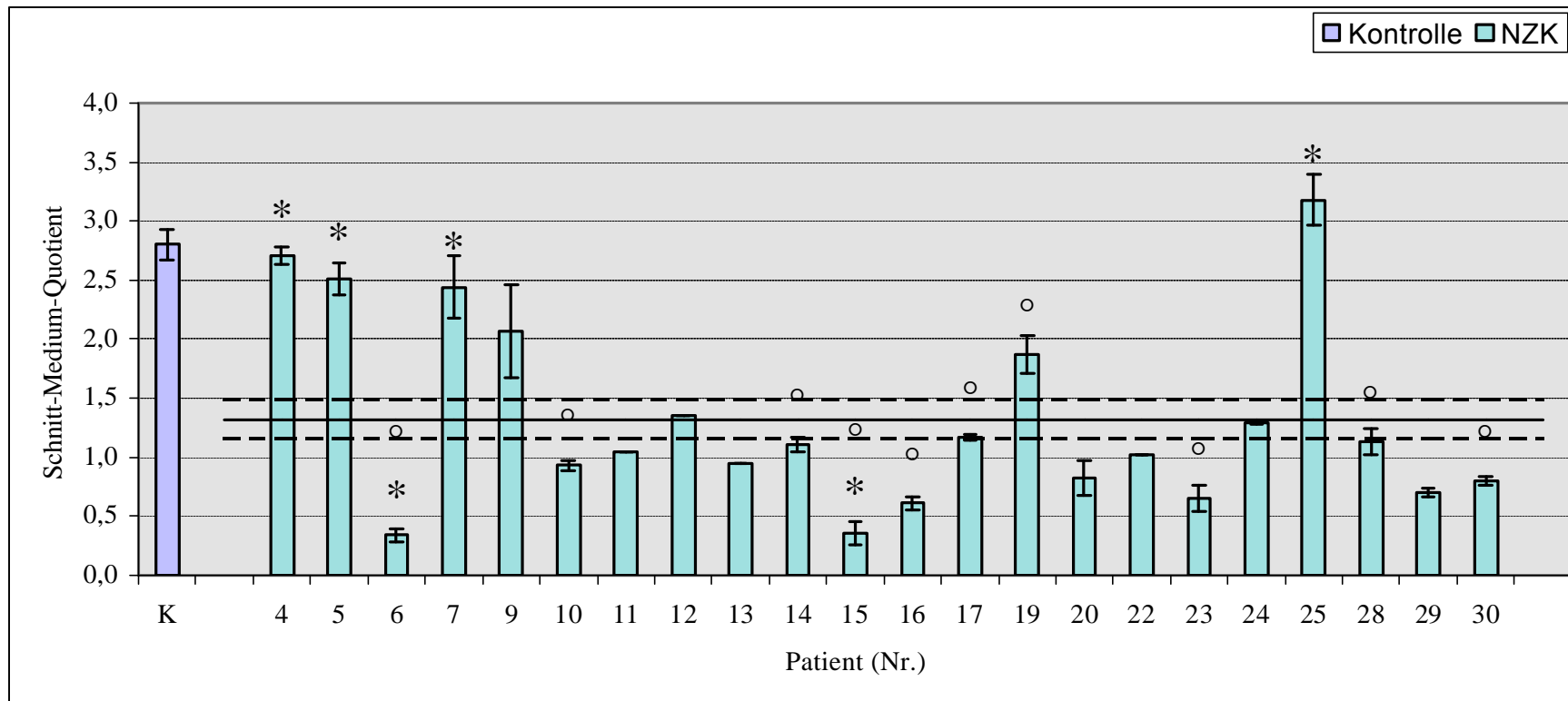
° = signifikanter Unterschied zum Mittelwert (durchgehende Bande) aller NZK-Patienten ( $p \leq 0,05$ )

Das heißt, im Nierenzellkarzinomgewebe sind die aktiven Eintransporte entweder nicht mehr funktionstüchtig bzw. gar nicht exprimiert (s. Einleitung) oder es liegen Bedingungen vor, unter denen der PAH-Austransport aus der Zelle effektiver als die PAH-Aufnahme ist.

### **3.2.2 PAH-Akkumulation in Nierenzellkarzinomgewebe des Menschen nach 24-stündiger Inkubation**

Auch nach 24-stündiger Inkubationsdauer wurde PAH von intaktem menschlichem Nierengewebe um den Faktor 3 akkumuliert (**Abbildung 14**). Dieser Wert ist zwar deutlich geringer als im Akutversuch (**Abbildung 13**), liegt aber dennoch wesentlich oberhalb von 1, so dass man auch nach 24 Stunden Inkubationszeit von einer aktiven PAH-Aufnahme in gesundes menschliches Gewebe ausgehen kann. Anders verhält sich das Nierenzellkarzinomgewebe: im Vergleich zum Akutversuch nahm die PAH-Akkumulation im Gewebe nach einer 24-stündigen Inkubation sogar zu ( $Q_{S/M}$  : 1,32 vs. 1,02; vergleiche **Abbildung 13** und **Abbildung 14**).

Interessant war, dass sich die verschiedenen Nierenzellkarzinomgewebeproben unterschiedlich verhielten: Von 22 untersuchten Proben wiesen 17 nahezu keine PAH-Akkumulation im Schnitt auf ( $Q_{S/M} \approx 1$ ). Unter diesen Proben gibt es für 5 Patienten (Nr. 23, 24, 28, 29, 30) Vergleichswerte mit den Untersuchungen der Akutversuche. Die PAH-Akkumulationswerte dieser NZK-Gewebeproben beider Versuchsansätze liegen um den Wert 1, so dass die Akkumulationsfähigkeit des Nierentumorgewebes auch nach 24-stündiger Inkubationszeit nicht gesteigert werden konnte. Bei 5 Patienten lag die PAH-Akkumulation zwischen 2-3. Leider gab es in dieser Patientengruppe aufgrund zu geringen Probenmaterials nur für einen Patienten (Pat.-Nr. 25) einen Kontrollwert der Akutversuche. Eine Steigerung der PAH-Akkumulation bei diesem Patienten um ca. 200 % im Langzeitversuch, verglichen mit dem Akutversuch, könnte mit der makroskopischen Auffälligkeit des untersuchten Gewebes in Zusammenhang stehen. Möglicherweise enthielt die Probe neben NZK-Gewebe noch anderes, nicht maligne entartetes Gewebe. Somit lässt sich nicht differenzieren, ob es zu einer Verbesserung der PAH-Akkumulationsfähigkeit im NZK-Gewebe dieser Probe während der 24-stündigen Inkubationszeit gekommen ist oder ob schon eine höhere Akkumulationskapazität für PAH in „intaktem“ Gewebe, dass in den Schnitten enthalten war, zu Beginn der Inkubation vorlag.



**Abbildung 14**

PAH-Akkumulation (Schnitt-Medium-Quotient) in Nierenzellkarzinomgewebe (NZK) nach 24-h-Inkubation in Williams E-Medium im Vergleich zu gesundem menschlichem Nierengewebe (K).

Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n = 2-4$  Messungen pro Patient;

° = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (K: 8 Patienten), ( $p \leq 0,05$ );

\*= signifikanter Unterschied zum Mittelwert (durchgehende Bande) aller NZK-Patienten ( $p \leq 0,05$ )

### **3.2.3 Einfluss von Dexamethason und Triiodthyronin (T<sub>3</sub>) auf die PAH-Akkumulation in Nierenzellkarzinomgewebe des Menschen**

Wie bereits erwähnt, lag der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf der Untersuchung des Einflusses einer *in vitro*-Inkubation von menschlichem Nierenzellkarzinomgewebe mit Dexamethason und Triiodthyronin auf dessen PAH-Akkumulationsfähigkeit.

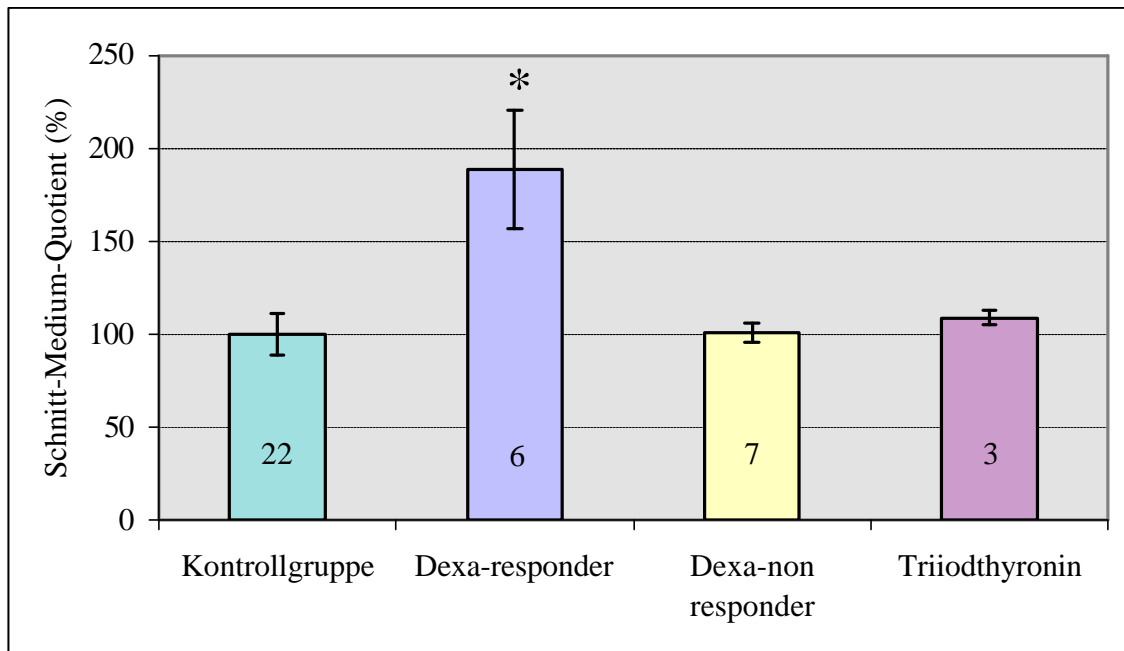
Im Gegensatz zu Versuchen an gesundem Nierengewebe der Ratte (s. 3.1.2) übt Dexamethason nach 2-stündiger Einwirkzeit keinen Einfluss auf die PAH-Akkumulation im NZK-Gewebe des Menschen aus. Die Schnitt-Medium-Quotienten bleiben bei unterschiedlichen Dexamethasonkonzentrationen bei annähernd 1 (nicht dargestellt).

Durch Dexamethasonzusätze im Williams E-Medium konnten in früheren Untersuchungen an intaktem menschlichem Nierengewebe (FLECK et al., 1998) nach 24-stündiger Inkubation eine konzentrationsabhängige Steigerung der PAH-Akkumulation um das ca. 1,5-fache nachgewiesen werden. In eigenen Vorversuchen an der Ratte (s. 3.1.2) konnten ebenso signifikante Akkumulationssteigerungen für PAH um ca. 1/3 durch Dexamethasonvorbehandlungen erzielt werden.

Nach 24-stündiger Dexamethasoninkubation von menschlichem Nierenzellkarzinomgewebe stellte sich eine deutliche Gruppierung bezüglich der Ansprechbarkeit auf Dexamethason heraus. Von 13 mit Dexamethason behandelten Gewebeproben ließen sich 6 Patienten als „Responder“ und 7 als „Non Responder“ klassifizieren (**Abbildung 15**).

Der durchschnittliche Stimulationseffekt lag bei den „Respondern“ bei  $189\% \pm 32\%$  im Vergleich zu Nierenzellkarzinomgewebe der selben Patienten, das nicht mit Dexamethason inkubiert wurde.

Bei den „Non Respondern“ unterschieden sich die  $Q_{S/M}$ -Werte nach Dexamethasoninkubation nicht signifikant von den zugehörigen Kontrollwerten.



**Abbildung 15**

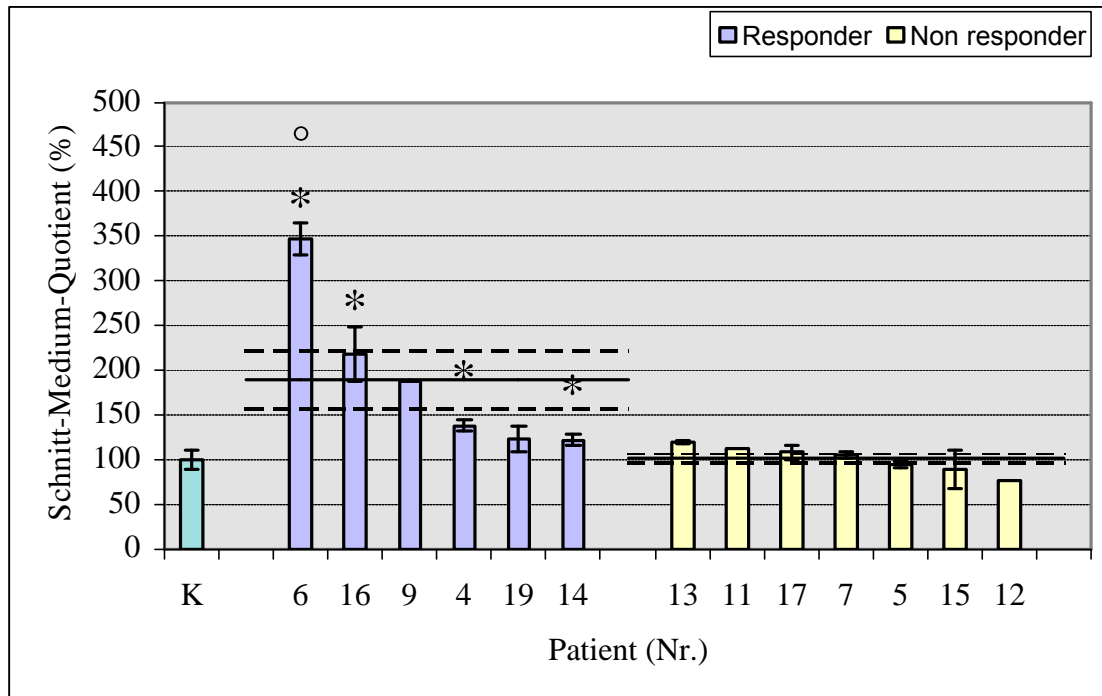
Einfluss von Dexamethason (Dexa) bzw. Triiodthyronin auf die PAH-Akkumulation (Schnitt-Medium-Quotient, 24-h-Inkubation) in Nierenzellkarzinomgewebe des Menschen. Die Patienten, deren Nierenrindenschnitte mit Dexamethason inkubiert wurden, ließen sich in "Responder" und "Non Responder" unterteilen.

Bei den Dexa- vorbehandelten Gewebeproben wurden jeweils die maximal zu erreichenden Stimulationseffekte, unabhängig von der jeweiligen Dexa-Konzentration im Medium, zusammengefasst. Eine detaillierte Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit der Stimulation ist Abb.17 zu entnehmen.

Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; Zahl in den Säulen = Anzahl der Patienten;

\*= signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ( $p \leq 0,05$ )

Die **Abbildung 16** zeigt die der **Abbildung 15** zugrunde liegenden Einzelwerte für Dexamethason. Für jeden Patienten ist die jeweils maximal auslösbare Stimulation, unabhängig von der eingesetzten Dexamethasonkonzentration, dargestellt.



**Abbildung 16**

Einfluss von Dexamethason auf die PAH-Akkumulation (Schnitt-Medium-Quotient, 24-h-Inkubation) in Nierenzellkarzinomgewebe des Menschen.

Die Abbildung zeigt die der Abb.15 zugrunde liegenden Einzelwerte. Die Patienten wurden in „Responder“ und „Non Responder“ unterteilt. Für jeden Patienten ist die jeweils maximal auslösbare Stimulation, unabhängig von der eingesetzten Dexamethasonkonzentration, verglichen worden.

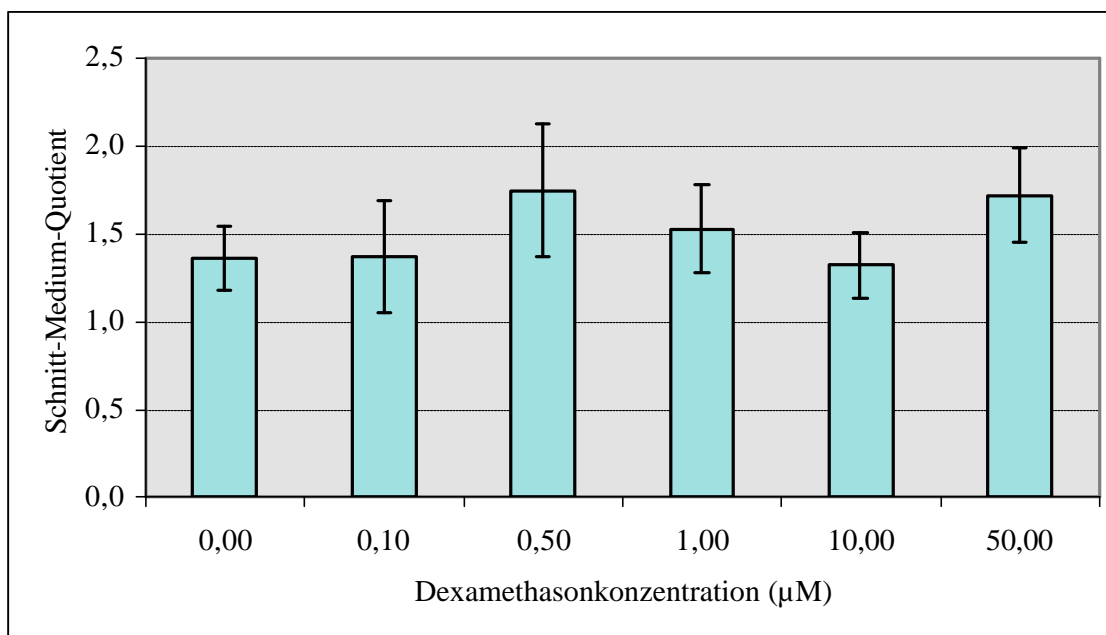
Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n = 2-4$  Messungen pro Patient

Durchgehende Linien = Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler

\* = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (K), ( $p \leq 0,05$ );

° = signifikanter Unterschied zum Mittelwert der „Responder“ ( $p \leq 0,05$ )

Im Gegensatz zu intaktem menschlichen Nierengewebe (FLECK et al., 1998) ließ sich in Nierenzellkarzinomgewebe kein Konzentrationsoptimum für die *in vitro*-Stimulation mit Dexamethason bestimmen (**Abbildung 17**). In intaktem Nierengewebe konnten bei einer Dexamethasonkonzentration von  $1 \mu\text{M}$  im Inkubationsmedium die stärkste Zunahme der Akkumulationswerte für PAH gemessen werden (FLECK et al., 1998). Dagegen reagierten die Nierenzellkarzinomschnitte der einzelnen Patienten bei verschiedenen Dexamethasonkonzentrationen unterschiedlich.



**Abbildung 17**

Einfluss von Dexamethason auf die PAH-Akkumulation (Schnitt-Medium-Quotient, 24-h-Inkubation) in menschlichem Nierenzellkarzinomgewebe.

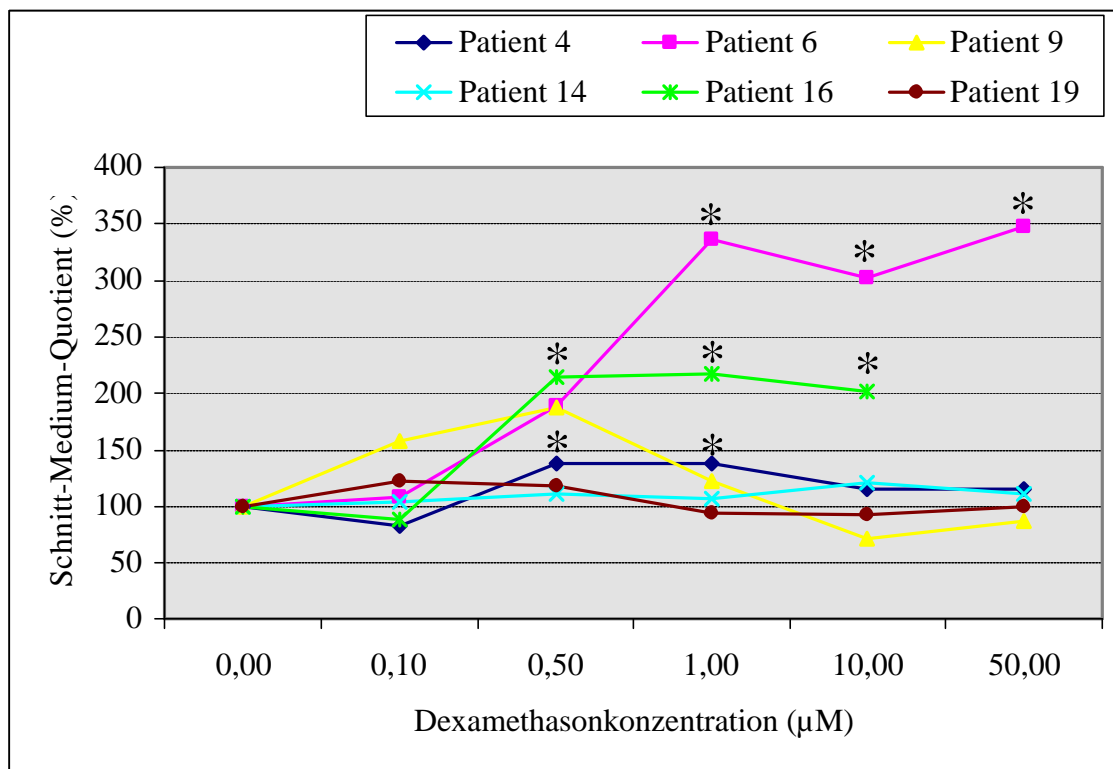
Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler;  $n = 2-4$  Messungen pro Konzentration bei insgesamt 13 Patienten

Um dennoch zu einer Aussage über die Konzentrationsabhängigkeit der Dexamethasonwirkung zu gelangen, sind in **Abbildung 18** die Konzentrationsabhängigkeiten für die Dexamethason-„Responder“ dargestellt. Es zeigte sich, dass der maximale Stimulationseffekt am häufigsten bei den Dexamethasonkonzentrationen 0,5 und 1 µM auftrat. Eine Ausnahme bildete Patient 6. Bei ihm nahm die maximale PAH-Akkumulation bis zu einer Konzentration von 50 µM stetig zu.

Die Akkumulationskapazität im Nierenzellkarzinomgewebe der Patienten 4, 9, 14 und 19 nahm bei höheren Dexamethasonkonzentrationen im Inkubationsmedium wieder ab und erreichte bei 50 µM lediglich den Wert nicht vorbehandelter Nierenzellkarzinomgewebepuben.

Ein ähnliches Verhalten wurde für das Nierengewebe der Ratte gefunden (s. 3.1): Bis zu einer Dexamethasonkonzentration von 0,5 µM nahm die PAH-Akkumulation zu. Bei höheren Konzentrationen verringerten sich die  $Q_{S/M}$ -Werte und erreichten wieder das Niveau der nicht mit Dexamethason inkubierten Gewebepuben (s. **Abbildung 5**).





**Abbildung 18**

Einfluss von Dexamethason auf die PAH-Akkumulation (Schnitt-Medium-Quotient in %, 24-h-Inkubation) in menschlichem Nierenzellkarzinomgewebe der „Dexa-Responder“

Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, n = 2-4 Messungen pro Patient und Konzentration;

\* = signifikanter Unterschied zum Kontrollwert ohne Dexa. ( $p \leq 0,05$ )

In Übereinstimmung mit früheren Arbeiten an der Ratte und an intaktem menschlichen Nierengewebe (FLECK et al., 1998) wurde durch  $T_3$  auch in menschlichem Nierenzellkarzinomgewebe keine Stimulation der PAH-Akkumulation erzielt (s. **Abbildung 15**).

Bei keiner der drei verwendeten  $T_3$ -Konzentrationen zeigte sich eine Stimulation der PAH-Aufnahme des Nierenzellkarzinomgewebes (nicht dargestellt). Der Schnitt-Medium-Quotient lag bei Werten um 1. Durch  $T_3$  konnte auch in den Versuchen an NRS der Ratte kein Stimulationseffekt bezüglich der PAH-Anreicherung nachgewiesen werden (s. **Abbildung 7**), so dass weiterführende Versuche zum Einfluss von  $T_3$  auf die renale Transportkapazität nicht vorgenommen wurden.

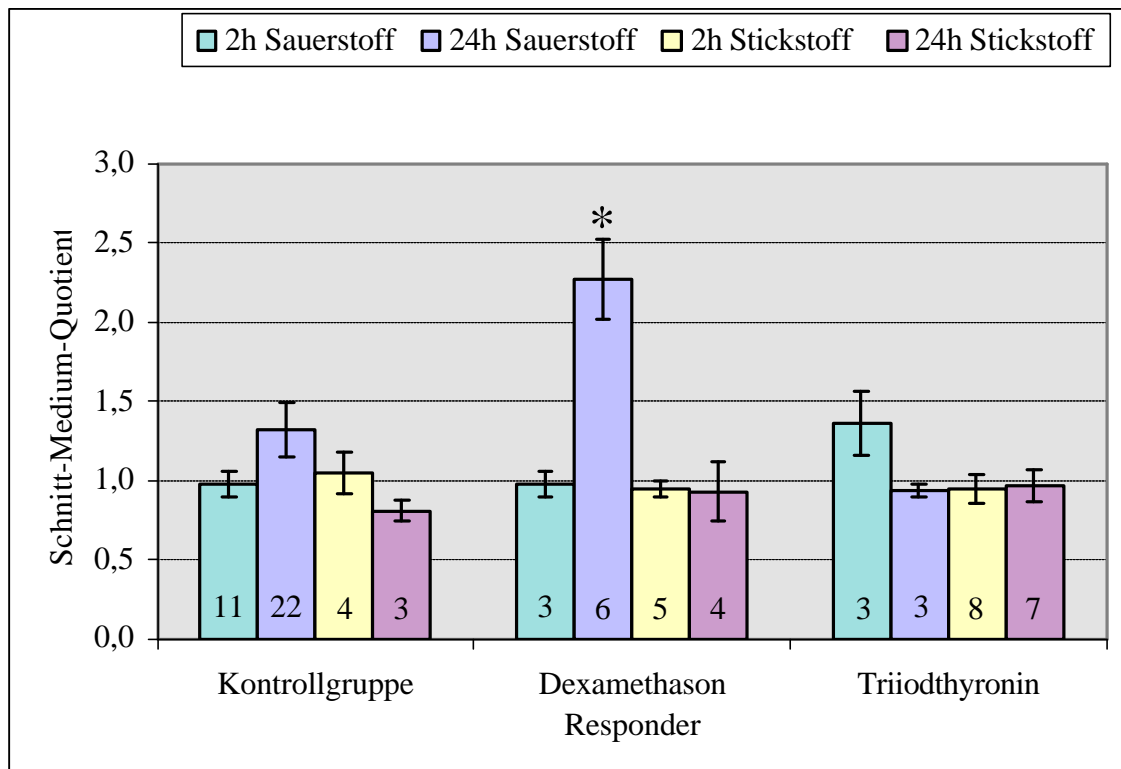
Die in der Zielstellung dieser Arbeit formulierten ergänzenden Korrelationen zur Charakterisierung der Stimulierbarkeit des Nierenzellkarzinomgewebes vom Menschen bezüglich seiner PAH-Akkumulationsfähigkeit ergaben, sicherlich bedingt durch die relativ geringe Fallzahl, dass offensichtlich keine Zusammenhänge zwischen dem Tu-

morstadium/Grading und der Stimulierbarkeit bestehen (nicht dargestellt). Auch war es nicht möglich, statistisch gesicherte Aussagen zur Alters- und Geschlechtsabhängigkeit der Stimulierbarkeit des PAH-Transportes in Nierenzellkarzinomgewebe zu erhalten. Für genauere statistische Auswertungen dieser Zusammenhänge wäre eine größere Zahl an Patienten notwendig gewesen, so dass auf eine Darstellung der vorläufigen Ergebnisse verzichtet wurde. Allerdings lässt das Fehlen einer klaren Korrelation zwischen den genannten Einflussfaktoren und der PAH-Transportkapazität den Schluss zu, dass möglicherweise vorhandene Abhängigkeiten zwischen Tumorstadium, Alter und Geschlecht von geringer praktischer Relevanz sein müssen, da sie sich andernfalls auch schon bei Betrachtung der vergleichsweise geringen Fallzahl der vorliegenden Untersuchungen hätten abzeichnen müssen.

### **3.2.4 Abhängigkeit der Stimulation der PAH-Akkumulation von der Energiebereitstellung**

Um den aktiven, energieabhängigen Anteil am Transport von PAH in Nierenrindenschnitten näher zu charakterisieren, wurden Versuche durchgeführt, in denen die PAH-Aufnahme in die Gewebeproben unter Sauerstoff- bzw. Stickstoffatmosphäre verglichen wurde (**Abbildung 19**). Die Vorinkubation mit Dexamethason bzw.  $T_3$  erfolgte wie üblich unter Carbogenbegasung.

Erwartungsgemäß (siehe Versuche an Nierengewebe der Ratte, 3.1) kam es in der Kontrollgruppe sowohl im Akut-, als auch im Langzeitversuch unter Stickstoffbegasung zu keiner aktiven PAH-Anreicherung im Nierenzellkarzinomgewebe ( $Q_{S/M} \approx 1$ ). Somit lag die PAH-Aufnahme im selben Bereich wie unter aeroben Inkubationsbedingungen. D.h., ein in der Tumorzelle möglicherweise vorhandener gesteigerter Austransport von PAH, der unter aeroben Bedingungen einer PAH-Akkumulation entgegenwirken würde, scheint von untergeordneter Bedeutung zu sein, lässt sich aber unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht gänzlich ausschließen, da es sowohl unter Sauerstoff- als auch unter Stickstoffbegasung im Nierenzellkarzinomgewebe zum Äquilibrium der Konzentrationen im Medium und im Schnitt kommt. Die Untersuchungen der PAH-Aufnahme unter anaeroben Bedingungen ( $N_2$ ) sprechen aber dafür, dass die intrazelluläre Bindung von PAH im Nierenzellkarzinomgewebe nicht verändert zu sein scheint.



**Abbildung 19**

Abhängigkeit der PAH-Akkumulation im NZK-Gewebe von der Energiebereitstellung: Vergleich der PAH-Aufnahme (Maximaleffekte) unter verschiedenen experimentellen Bedingungen ( $O_2/N_2$ -Begasung, Inkubationszeit, Hormoninkubation).

Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n = 2-4$  Messungen pro Patient;

Zahl in den Säulen = Anzahl der Patienten;

\* = signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrollgruppe ohne Hormoninkubation, ( $p \leq 0,05$ ).

Ebenso führte eine 2- bzw. 24-stündige Inkubation der Gewebeproben mit Dexamethason bzw. Triiodthyronin unter Stickstoffatmosphäre zu keiner Veränderung der PAH-Aufnahme in den Schnitten ( $Q_{S/M} \approx 1$ ). Somit scheint auch unter diesen Bedingungen die intrazelluläre Bindung von PAH im Nierengewebe nach Inkubation in hormonhaltigem Medium unbeeinflusst zu sein. Andererseits ist aber auch nicht von einem vermehrten Austransport von PAH aus der hormonvorbehandelten Nierentumorzelle auszugehen, da sonst unter Stickstoff ohne Hormonzugabe die intrazelluläre PAH-Konzentration erhöht sein müsste ( $Q_{S/M} \gg 1$ ). Schließlich sprechen diese Ergebnisse dafür, dass für den Dexamethason-induzierten Stimulationseffekt eine ausreichende Energiebereitstellung während der 24-stündigen Vorinkubation notwendig ist. Das ist

ein weiterer Beleg für unsere Hypothese, dass Dexamethason spezifisch den aktiven Transport von PAH zu stimulieren vermag.

### **3.2.5 Bestimmung der Konzentration von $K^+$ , GSH und GSSG zur Charakterisierung der Funktionsfähigkeit der Zellen des intakten Nierengewebes und des Nierenzellkarzinomgewebes vom Menschen**

Die Konzentrationen von GSH, GSSG und Kalium unterschieden sich sowohl nach 2- als auch nach 24-stündiger Inkubation mit und ohne Hormonzusatz überraschenderweise nicht signifikant zwischen intaktem menschlichen Nierengewebe und Nierenzellkarzinomgewebe (**Tabelle 6**). Die Konzentration von reduziertem Glutathion (GSH) in menschlichem Nierenzellkarzinomgewebe wies nach 24 stündiger Inkubation annähernd die gleichen Werte auf wie nach 2 stündiger Inkubation. Eine Beeinflussung durch die Hormone Dexamethason und Triiodthyronin war nicht nachweisbar. Ähnliche Ergebnisse ließen sich schon in Versuchen mit Nierengewebe der Ratte erkennen (s. 3.1).

Anders verhielt sich der Gehalt an oxidiertem Glutathion (GSSG) im Nierenzellkarzinomgewebe des Menschen. Nach 24 Stunden war ein deutliches Absinken der GSSG-Konzentration gegenüber dem 2-Stunden-Versuch zu messen. Die Abnahme der GSSG-Konzentration ließ sich durch Dexamethason und  $T_3$  nicht verhindern (s. **Tabelle 6**). Damit entsprechen auch diese Ergebnisse den Befunden, die im Tierversuch nach 24 stündiger Inkubation erhoben worden sind. Ein Hormoneffekt konnte auch in Untersuchungen an Nierengewebe der Ratte nicht beobachtet werden (s. 3.1).

Die intrazelluläre Kaliumkonzentration in menschlichem Nierenzellkarzinomgewebe blieb auch nach den Langzeitversuchen annähernd unverändert, so dass auch nach 24 Stunden noch genügend Kalium in der Zelle vorhanden war, um die Funktionstüchtigkeit während des Versuchsablaufes aufrechtzuerhalten. Der Kaliumgehalt in der Zelle wurde durch die Hormone Dexamethason und Triiodthyronin nicht verändert (s. **Tabelle 6**).

Es ist bemerkenswert, dass im Vergleich zu den Versuchen an Nierengewebe der Ratte die Konzentrationen an Kalium in menschlichem Nierengewebe deutlich geringere Werte aufwiesen (vgl. **Tabelle 6** und **Abbildungen 11-12**), ein Effekt, der möglicher-

weise durch die im Methodenteil angesprochene längere warme Ischämiezeit in den Versuchen an menschlichem Gewebe bedingt ist.

**Tabelle 6:** Einfluss von Dexamethason (Dexa) bzw. Triiodthyronin ( $T_3$ ) auf die intrazelluläre Konzentration an reduziertem (GSH) und oxidiertem (GSSG) Glutathion sowie die Kaliumkonzentration in intaktem menschlichen Nierenrindengewebe (n = 5 Patienten = Kontrollen) und in Nierenzellkarzinomgewebe (NZK; n = 7 Patienten) nach 2- bzw. 24-stündiger Inkubation unter Sauerstoffbegasung. Als Bezugswert dienen Gewebeprobe, denen während der Inkubation 0,9 % NaCl zugesetzt worden ist. Arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, n = 3-4 Messungen pro Patient.

	2-Stunden-Inkubation						24-Stunden-Inkubation					
	Kontrollen			NZK			Kontrollen			NZK		
	NaCl	Dexa	$T_3$	NaCl	Dexa	$T_3$	NaCl	Dexa	$T_3$	NaCl	Dexa	$T_3$
GSH	1210	1520	1405	948	1184	932	725	710	860	984	731	846
[ $\mu$ M]	$\pm 150$	$\pm 195$	$\pm 120$	$\pm 47$	$\pm 62$	$\pm 34$	$\pm 30$	$\pm 60$	$\pm 40$	$\pm 51$	$\pm 103$	$\pm 39$
GSSG	320	290	169	307	267	283	150	185	182	131	182	131
[ $\mu$ M]	$\pm 35$	$\pm 25$	$\pm 65$	$\pm 94$	$\pm 74$	$\pm 74$	$\pm 10$	$\pm 15$	$\pm 44$	$\pm 36$	$\pm 14$	$\pm 24$
Kalium	49	62	53	49	53	48	36	53	42	44	48	43
[ $\mu$ mol/g]	$\pm 4$	$\pm 4$	$\pm 3$	$\pm 4$	$\pm 3$	$\pm 3$	$\pm 4$	$\pm 7$	$\pm 4$	$\pm 5$	$\pm 2$	$\pm 3$

## 4 Diskussion

Seit Mitte der 70er Jahre ist bekannt, dass sich der tubuläre PAH-Transport in der Rattenniere durch eine *in vivo*-Vorbehandlung der Tiere mit Glukokortikoiden, Schilddrüsenhormonen und anderen Substanzen stimulieren lässt (BRÄUNLICH, 1981, 1987, 1988; BRÄUNLICH et al., 1986; FLECK und BRÄUNLICH, 1995). Eine derartige Vorbehandlung führte auch *in vitro* zu einer signifikanten Zunahme der PAH-Akkumulationsfähigkeit in Nierenrindenschnitten der Ratte (BRÄUNLICH et al., 1993; FLECK, 1997). Da analoge *in vivo*-Versuche am Menschen aus ethischen Gründen nicht durchführbar waren, wurde im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FSU Jena ein Versuchsansatz entwickelt, in dem die hormonelle Beeinflussbarkeit der renalen Transportfunktion *ex vivo* untersucht werden kann. In vorangegangenen *in vitro*-Untersuchungen am o.g. Institut konnte der Einfluss von Dexamethason und T<sub>3</sub> auf den renalen PAH-Transport der Ratte bestätigt werden (FLECK, 1997). Aufbauend auf diesen Befunden gelang es, auch für intaktes menschliches Nierengewebe *in vitro* die PAH-Transportkapazität zu bestimmen und die hormonelle Regulation der PAH-Aufnahme in die menschliche Nierentubuluszelle näher zu charakterisieren (FLECK et al., 1997b, 1998). Die bis dato durchgeführten Versuche dienten ausschließlich der Grundlagenforschung; der klinisch relevante Aspekt der Untersuchungen war Ziel der vorliegenden Studie: Es sollte untersucht werden, ob auch in menschlichem Nierenzellkarzinomgewebe durch Dexamethason bzw. Triiodthyronin die Fremdstoffaufnahme stimuliert werden kann. Als Modellsubstanz diente zunächst PAH, da über diese Verbindung bereits umfangreiche Literaturdaten existierten. Da schlussendlich das Ziel des gesamten Versuchsprojektes darin besteht, die Aufnahme von Zytostatika im NZK zu verbessern, um die in der Einleitung erwähnte MDR zu überwinden, stellen auch die vorliegenden Befunde nur ein „Zwischenergebnis“ dar, auf dessen Basis weiterführende Untersuchungen zur Aufnahme von Zytostatika in das Nierenzellkarzinom vorgesehen sind.

## **4.1 PAH als Modellsubstanz für die renale tubuläre Sekretion**

P-Aminohippursäure ist zum Nachweis der renalen tubulären Sekretionskapazität gut geeignet. Sie wird durch glomeruläre Filtration und tubuläre Sekretion ausgeschieden und stellt u. a. ein Mass für den effektiven Nierenplasmastrom dar, da eine Rückresorption von PAH nicht erfolgt. Organische Anionen wie PAH werden durch die basolaterale Membran des proximalen Nierentubulus im Austausch mit intrazellulärem  $\alpha$ -Ketoglutarat transportiert. Dieser Mechanismus ist indirekt an die Natriumaufnahme über den  $\text{Na}^+/\alpha$ -Ketoglutarat-Cotransport gekoppelt (VILLALOBOS et al., 1996). Erst kürzlich wurde in der basolateralen Membran der proximalen Tubuluszellen ein PAH/2-Oxoglutarat-Austauscher cloniert, der PAH aus dem Blut in die Tubuluszelle und intrazelluläres 2-Oxoglutarat aus der Zelle in die Blutbahn transportiert (HOSOYAMADA et al., 1999; LU et al., 1999; SEKINE et al., 1997; SWEET et al., 1997; WOLFF et al., 1997). Auch für den Transport von PAH durch die apikale Membran in das Tubuluslumen sind verschiedene Mechanismen auf der Basis von Untersuchungen an isolierten renalen Bürstensaummembranvesikeln diskutiert worden, die von einem Antiporter für die PAH-Sekretion im Austausch gegen Urat ausgehen (ROCH-RAMEL et al., 1996; SCHMITT und BURCKHARDT, 1993). Untersuchungen mit amphiphilen Anionen, die mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert worden sind, charakterisierten den Transport von den Tubuluszellen in das Lumen als einen Carrier-vermittelten Prozess (MASE-REEUW et al., 1999; MILLER et al., 1996). Als weiteres Transportprotein für PAH aus der Tubuluszelle in das Tubuluslumen ist erst vor kurzem das Multidrugresistance protein 2 (MRP2) in der apikalen Membran proximaler Tubulusepithelien menschlicher Nieren identifiziert worden (SCHAUB et al., 1999). Die Autoren zeigten in ihren Untersuchungen, dass die MRP2-Expression im NZK zu 95 % nachweisbar ist. In früheren Untersuchungen wurde MRP2 in Hepatozyten nachgewiesen und als Kanal-MDR-Protein (BÜCHLER et al., 1996) bzw. als kanalspezifischer organischer Anionentransporter (PAULUSMA et al., 1996) bezeichnet. Analog zur hepatobiliären Elimination amphiphiler organischer Anionen durch MRP2 (KEPPLER und KARTENBECK, 1996), spielt dieses Transportprotein auch für die Sekretion dieser Substanzen in den proximalen Tubuluszellen der Niere eine wichtige Rolle (LEIER et al., 2000).

PAH diene als Modellsubstanz, um zu generellen Aussagen zum Fremdstofftransport in der menschlichen Niere, speziell in den Zellen des NZK zu gelangen. An die Untersu-

chungen zum Transport von PAH werden sich Versuche mit Zytostatika, wie z.B. cis-Platin, Tomudex, Topotecan oder Methotrexat, die in der Behandlung von Nierenzellkarzinomen angewendet wurden bzw. werden, anschließen. Eine erfolgreiche medikamentöse Therapie dieser malignen Erkrankung wird durch die MDR (s. auch 1.3.3) des Tumors erschwert. Die Stimulation der PAH-Akkumulation in den Nierentumorzellen durch Hormone wie Dexamethason bzw. Triiodthyronin könnte ein möglicher Weg zur Überwindung der MDR sein und somit das Ansprechen der NZK, speziell seiner Metastasen, auf Zytostatika verbessern helfen. Selbstverständlich darf dabei nicht außer Acht gelassen werden, dass sich der Transport von PAH von dem der meisten Zytostatika in vielerlei Hinsicht unterscheidet.

## **4.2 PAH-Akkumulation in Nierengewebe der Ratten und deren *in vitro*-Stimulierbarkeit**

Seit langem ist bekannt, dass man *in vitro* an Nierenrindenschnitten der Ratte den tubulären Transport organischer Säuren, z.B. PAH, untersuchen kann (STOPP und BRÄUNLICH, 1980). Die Akkumulation von PAH im Nierengewebe ( $Q_{S/M}$ ) dient als Mass der tubulären Sekretionsfähigkeit, da gezeigt werden konnte, dass unter den von uns gewählten Inkubationsbedingungen die Lumina der Tubuli kollabiert sind und somit kein Austransport des aktiv aufgenommenen PAH an der luminalen Membran erfolgen kann (KINNE, 1991). Die Untersuchung der PAH-Akkumulation ist im Vergleich zur Messung der PAH-Ausscheidung *in vivo* besser geeignet, Rückschlüsse auf renale Prozesse, die dem tubulären Transport zugrunde liegen, zu ziehen, da nervale und hormonelle Einflüsse sowie Veränderungen der Nierendurchblutung die Ergebnisse nicht beeinflussen können (PARRISH et al., 1995). Somit stellen derartige Untersuchungen ein Bindeglied zwischen Versuchen am Ganztier und Experimenten auf zellulärer Ebene dar, deren Ergebnisse direkt Rückschlüsse auf zelluläre Transportmechanismen zulassen, die aber dennoch auch Aussagen über den Fremdstofftransport *in vivo* gestatten (STOPP und BRÄUNLICH, 1980). Hinzu kommt, dass Gewebeentnahmen von Versuchstieren bisher lediglich anzeigepflichtig sind, wodurch die Versuchsdurchführung unter administrativen Gesichtspunkten vergleichsweise leicht möglich ist. Somit konnte in den Vorversuchen an Nierenrindenschnitten der Ratte ein optimales Herangehen für die Untersuchungen menschlichen Nierengewebes entwickelt werden.



In den sog. Akutversuchen, d.h. der Messung der PAH-Akkumulation in frisch entnommenem Nierengewebe der Ratte, konnten früher erhobene Befunde reproduziert werden:

Die PAH-Aufnahme ist zeit-, konzentrations-, temperatur- und energieabhängig – Kriterien, die die aktive Aufnahme von PAH in der Tubuluszelle belegen (STOPP und BRÄUNLICH, 1975). Da es sich bei diesen Befunden um allgemein bekannte Daten handelt, sind sie im Ergebnisteil nicht im Detail dargestellt worden. Wichtiger erschien uns zu verifizieren, dass die PAH-Aufnahmefähigkeit auch nach mehrstündiger Inkubation (24-48 Stunden) erhalten bleibt. Auch wenn die  $Q_{S/M}$ -Werte mit zunehmender Inkubationsdauer deutlich zurückgehen, lässt sich auch nach 24 (48) Stunden am Nierenrindengewebe der Ratte eine aktive PAH-Aufnahme nachweisen, da die  $Q_{S/M}$ -Werte ( $>>3$ ) sehr deutlich über 1 lagen und somit eine passive Diffusion als Ursache der Anreicherung von PAH in der Zelle ausgeschlossen werden kann. Für die Funktionstüchtigkeit der Schnitte nach Langzeitinkubation sprechen auch die von uns gemessenen Werte der intrazellulären Kaliumkonzentrationen als Maß für die Zellintegrität (MACRI et al., 1997) sowie die Konzentrationen an GSH und GSSG in der Zelle, die ebenfalls Rückschlüsse auf eine intakte Zellfunktion zulassen (KRETZSCHMAR, 1996). Darüber hinaus belegt der Vergleich der PAH-Aufnahme unter aeroben ( $O_2$ ) und anaeroben ( $N_2$ ) Inkubationsbedingungen eindeutig, dass auch nach 24 Stunden die PAH-Aufnahme in Nierenrindenschnitten der Ratte ein aktiver Prozess ist, da nach vorangegangener 24-stündiger Inkubation in PAH-freiem Williams E-Medium unter Carbogenbegasung die  $Q_{S/M}$ -Werte während der 2-stündigen PAH-Akkumulationsversuche unter Sauerstoffbegasung bei ca. 6 lagen, wogegen unter Stickstoffatmosphäre lediglich Werte um 1 erreicht wurden. Letzteres spricht für einen passiven PAH-Einstrom in die Tubuluszellen, der bei Erreichen eines Konzentrationsgleichgewichtes zum Erliegen kommt, da die geringe intrazelluläre Eiweißbindung von PAH für seine Anreicherung in der Tubuluszelle ohne Bedeutung ist (SPLINTER und BRÄUNLICH, 1973).

Wichtig für die Beantwortung unserer eingangs formulierten Fragestellung, ob sich die PAH-Akkumulation *in vitro* stimulieren lässt, war der zweite Teil der Vorversuche an Nierengewebe der Ratte. Hierbei sollte der Einfluss von Dexamethason und  $T_3$  auf die tubuläre Transportleistung erfasst werden. Auch in diesen Untersuchungen konnten früher gewonnene Befunde bestätigt werden (BRÄUNLICH et al., 1993; FLECK et al., 1997a). Die Wirkungen von Dexamethason und  $T_3$  unterscheiden sich deutlich voneinander, so dass man von verschiedenen Angriffsorten beider Hormone ausgehen muss.

Nach Dexamethason kommt es zeit- und dosisabhängig zu einer signifikanten Zunahme der PAH-Transportkapazität im Nierenrindengewebe der Ratte. Der Stimulationseffekt ist ab ca. 6 Stunden Einwirkungsdauer nachweisbar (FLECK et al., 1998). Ab dieser Zeitspanne kann man mit dem Ingangkommen der Neusynthese von PAH-Carrierproteinen rechnen (BERKHIN und VARSHAVSKY, 1975), so dass die in der Einleitung formulierte Hypothese, bei der Stimulation der PAH-Transporter handelt es sich um eine gesteigerte Expression der Transportproteine, untermauert wird. Weiterführende Untersuchungen sind am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FSU Jena in Zusammenarbeit mit dem Institut für Physiologie der Universität Göttingen (Direktor: Prof. Dr. G. Burckhardt) begonnen worden, in denen diese Hypothese mittels PCR-Untersuchungen belegt werden soll. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass es nach einer Vorbehandlung mit Dexamethason bzw.  $T_3$  tatsächlich zu einer vermehrten Expression von mRNA kommt, die für die Synthese spezifischer PAH-Transportcarrier verantwortlich ist (persönl. Mitteilung Dr. A. Bahn, Physiologisches Institut der Universität Göttingen).

Des weiteren ist der durch Dexamethason auslösbare maximale Stimulationseffekt im 24-Stunden-Versuch konzentrationsabhängig: bei einer Dexamethasonkonzentration von  $0,5 \mu\text{M}$  im Inkubationsmedium erreicht das Ausmaß der Stimulation ein Maximum; bei Einwirkung höherer Konzentrationen nimmt die PAH-Aufnahme wieder ab. Möglicherweise beruht dieses Phänomen auf bereits toxischen Effekten des Dexamethasons (katabole Wirkung, Energieverarmung) oder aber es kommt nach Dexamethason in hoher Konzentration zu einem Überwiegen der Stimulation von Transportern, die, ähnlich wie nach  $T_3$ -Inkubation, zu einem vermehrten Austransport von PAH an der basolateralen Membran der Tubuluszelle führen. Wie oben genannt, ist eine Zunahme der luminalen PAH-Ausscheidung aus der Tubuluszelle eher unwahrscheinlich, da die Tubuluslumina verschlossen sind. Die letztliche Ursache der Konzentrationsabhängigkeit der Dexamethasonwirkung lässt sich aufgrund unserer Untersuchungen allerdings nicht differenzieren.

Anders verhielt sich die PAH-Akkumulation nach Vorinkubation mit  $T_3$ -haltigem Williams E-Medium: die PAH-Aufnahme war proportional zur eingesetzten  $T_3$ -Konzentration vermindert. Da sowohl in den Versuchen mit  $T_3$  als auch mit Dexamethason die PAH-Akkumulation unter Stickstoffbegasung ausblieb ( $Q_{S/M}$ -Werte  $\approx 1$ ), kann man eine Veränderung der intrazellulären Bindung als Ursache für die unterschiedliche Hormoneffekte ausschließen. Sowohl Dexamethason als auch  $T_3$  üben, zwar unterschiedliche,

aber spezifische Wirkungen auf das Nierengewebe aus, deren zellulären Mechanismen in folgenden Untersuchungen näher charakterisiert werden müssen, da dies nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Vorversuche an Nierengewebe der Ratte folgende wesentliche Resultate erbracht haben:

- Die bereits mehrfach beschriebenen (STOPP und BRÄUNLICH, 1974) Inkubationsbedingungen (Inkubationsdauer und -temperatur, PAH-Konzentration im Medium, Mediumzusammensetzung etc.) wurden auch in unseren Akutversuchen als optimal geeignet herausgefunden, um die Fremdstoffakkumulation in NRS zu untersuchen.
- Nierengewebe der Ratte behält bei *in vitro*-Inkubation, zumindest bis zu 24 Stunden, eine hinreichende Transportkapazität, so dass während dieser Langzeitinkubation der Einfluss von Pharmaka auf renale Transportmechanismen untersucht werden kann.
- Zur hormonellen Beeinflussung der PAH-Akkumulation in Nierenrindenschnitten der Ratte ist Dexamethason in einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  gut geeignet. Die  $Q_{S/M}$ -Werte für PAH lassen sich durch Dexamethason um ca. ein Drittel signifikant steigern.
- $T_3$  ist in Versuchen an intaktem Nierengewebe der Ratte nicht in der Lage, die PAH-Transportkapazität zu stimulieren. Vielmehr kommt es sogar zu einer Abnahme der maximalen PAH-Aufnahme nach 24-stündiger Vorinkubation in  $T_3$ -haltigem Williams E-Medium. Möglicherweise ist letzteres Phänomen durch einen verstärkten Austransport von PAH aus der Tubuluszelle bedingt, der normalerweise durch den hocheffektiven Uptake maskiert wird (FLECK et al., 1997a, 1998).

### **4.3 PAH-Akkumulation in menschlichem Nierenzellkarzinomgewebe**

In der vorliegende Studie wurde der Einfluss von Dexamethason und Triiodthyronin auf die Akkumulation von PAH in gesundem menschlichem Nierengewebe und im NZK untersucht. Dabei kann davon ausgegangen werden, dass in erster Linie Transportprozesse erfasst werden, die an der basolateralen Membran, zumindest beim intakten Nie-

rengewebe, lokalisiert sind. Wie in der Einleitung beschrieben, ist im intakten Nierenrindenschnitt der Ratte das Tubuluslumen komplett kollabiert, so dass eine Aufnahme von PAH aus dem Lumen bzw. eine Abgabe von PAH in das Lumen ausgeschlossen ist. Inwieweit im NZK-Gewebe auch Transportprozesse an der apikalen Membran der Tumorzelle – vorausgesetzt, eine derartige Differenzierung ist in der NZK-Zelle überhaupt noch vorhanden – mit erfasst werden, kann aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht eindeutig geklärt werden. Allerdings ist die Beantwortung dieser Frage für die Charakterisierung der hormonellen Beeinflussung des PAH-Transportes im NZK auch nur von untergeordneter Bedeutung, da letztlich nur der „Nettoeffekt“ von Interesse ist. Des weiteren ist die Interpretation der Versuchsergebnisse durch Schwierigkeiten bei der Durchführung der Versuche erschwert, die sich aufgrund folgender Probleme ergaben:

- Fehlende Planbarkeit der Untersuchungen – die Versuche mussten ad hoc vorgenommen werden, sobald eine Tumornephrektomie anstand.
- Nicht bei jeder Tumornephrektomie fiel genügend Gewebe für die umfassende Durchführung unserer Untersuchungen an.
- Häufig lange Wartezeiten (= lange warme Ischämiezeiten) auf die Anlieferung der Gewebeproben aus der Urologischen Klinik der FSU Jena, da das Wohl des Patienten Vorrang hatte und sich im Operationssaal verschiedenen Arbeitsgruppen um die Weiterverarbeitung der resezierten Gewebeproben bemühten.
- Unterschiedliche Konsistenzen der NZK und daraus resultierend komplizierte Anfertigung einheitlicher Gewebeschnitte sowie fehlende Kenntnis der Histologie der verwendeten Schnitte.

Wie schon in früheren Untersuchungen gezeigt wurde, wird PAH sowohl in Nierenrindenschnitten der Ratte als auch des Menschen aktiv in der Nierentubuluszelle akkumuliert. Folgende neue Erkenntnisse wurden in der vorliegenden Arbeit gewonnen:

1. In Vorversuchen an der Ratte (s. 3.1) ließen sich frühere Untersuchungen (FLECK et al., 1997a, 1998) reproduzieren und optimieren, so dass eine Charakterisierung der PAH-Akkumulationskapazität in gesundem menschlichen Nierengewebe und im NZK erfolgen konnte.
2. Verglichen mit intaktem Nierengewebe des Menschen (FLECK et al., 1997b), ist NZK- Gewebe *in vitro* nicht in der Lage, aktiv PAH anzureichern.

Im proximalen Nierentubulus sind vorrangig aktive Transportvorgänge lokalisiert (s. **Abbildung 1**). PAH wird dabei in der Zelle nur in geringem Maße an Proteine oder andere Zellstrukturen gebunden. Ansonsten wäre auch in Abwesenheit von Sauerstoff eine PAH-Anreicherung in der Zelle möglich, in dem der freie PAH-Anteil in der Zelle durch intrazelluläre Bindung niedrig gehalten wird und dadurch ein Konzentrationsgradient an der Zellmembran zwischen IZR und umgebendem Inkubationsmedium aufrechterhalten bliebe. Träfe dies zu, wäre eine passive Aufnahme von PAH in die Zelle zu erwarten, die sich jedoch nicht nachweisen ließ (siehe Befunde unter anaeroben Inkubationsbedingungen, Kapitel 3.2.4). Eine aktive PAH-Aufnahme in die Tubuluszelle ist ausschliesslich bei ausreichender Energiebereitstellung, d.h. unter Anwesenheit von Sauerstoff, möglich. Das spiegeln sowohl die Ergebnisse dieser Arbeit als auch die früherer Studien (FLECK et al., 1997b) wider.

NZK-Gewebe des Menschen besitzt keine Akkumulationsfähigkeit für PAH. Mögliche Gründe könnten darin zu suchen sein, dass die Aufnahmemechanismen für PAH im Tumorgewebe aufgrund seiner malignen Entartung oder seiner Herkunft (siehe Einleitung: das NZK soll in 20 % der Fälle von Sammelrohrgewebe abstammen!) nicht existieren. PAH-Transportcarrier würden dann nicht exprimiert werden. Eine andere Erklärung könnte in einer für Tumoren typischen hohen Anzahl sogenannter Vielfachresistenzproteine (multidrug resistance proteins) bestehen. Das würde bedeuten, dass PAH zwar in der Tumorzelle aufgenommen wird, aber Mechanismen vorhanden sind, die für einen beschleunigten Austransport des eingedrungenen PAH aus der Zelle sorgen. Damit würde die Tumorzelle eine Schutzfunktion vor exogenen (und auch endogenen) Substanzen besitzen, die sie, z.B. im Falle der Einwirkung von Zytostatika, vor einer Zerstörung bewahren würde. Neben CUI et al. (1999) und KEPPLER et al. (1998a) beweisen die Untersuchungen von LEIER et al. (2000) das Vorhandensein von MRP2-Transportproteinen für den aktiven PAH-Export in das proximale Tubuluslumen, die neben MRP1 und MDR1 auch zur Familie der „multidrug resistance proteins“ gehören. Weiterführende Untersuchungen am NZK-Gewebe unter dem von LEIER et al. (2000) beschriebenen Versuchsansatz müssten sich noch anschliessen, um diese Hypothese zu untermauern, zumal unter diesen Bedingungen die Tubuluslumina nicht kollabieren. Unter unseren Versuchsbedingungen ist ein gesteigerter Austransport von PAH in das Tubuluslumen wenig wahrscheinlich, da diese, wie bereits erwähnt, nicht in der Lage sind, das ausgeschiedene PAH abzutransportieren. Bei anaeroben Inkubationsbedingungen erreichte die PAH-Akkumulation im NZK ebenfalls lediglich  $Q_{s/M}$ -Werte um 1.

Offensichtlich spielen Austransportmechanismen für PAH im Nierentumorgewebe eine untergeordnete Rolle, da es trotz ihrer Hemmung aufgrund des Sauerstoffmangels zu keiner PAH-Anreicherung im NZK-Gewebe gekommen ist. Letztlich ausgeschlossen ist damit das Vorhandensein von MDR-Transportern, die PAH aus der Tubuluszelle aktiv heraus transportieren, jedoch nicht, da natürlich unter  $N_2$ -Begasung auch ein möglicherweise vorhandener aktiver PAH-Eintransport im NZK gehemmt wäre.

Das multidrug resistance Protein (P-Glykoprotein), welches einen Hauptresistenzfaktor gegenüber der medikamentösen Therapie des NZK darstellt, ist kein Transportprotein für PAH. P-Glykoprotein unterscheidet sich deutlich in seiner Funktion und seiner Aminosäuresequenz von MRP1 und MRP2 (COLE et al., 1992; KEPPLER und KARTENBECK, 1996). P-Glykoprotein transportiert unter ATP-Verbrauch ein breites Spektrum lipophiler, meist kationischer Substanzen aus der Zelle hinaus (THIEBAUT et al., 1987; VAN HELVOORT et al., 1996), wohingegen MRP1 und MRP2 für einen energieabhängigen Austransport amphiphiler Anionen, wie z.B. Leukotriene ( $LTC_4$ ) und verschiedener anderer endogen gebildeter Glutathion-, Glucuronyl- und Sulfatverbindungen verantwortlich sind (CUI et al., 1999; EVERS et al., 1998; JEDLITSCHKY et al., 1994, 1996; KEPPLER et al., 1998a; LEIER et al., 1994; LOE et al., 1996).

Bekannte Inhibitoren für ATP-abhängige Transportpumpen sind Cyclosporin A und Leukotriene (BÖHME et al., 1993). LEIER et al. (2000) haben unter Verwendung von Cyclosporin A, Leukotrien  $C_4$ , Ochratoxin A sowie dem MRP-Transport-Inhibitor MK 571, welche die an der apikalen Membran proximaler Tubuluszellen lokalisierte ATP-abhängige Exportpumpe MRP2 inhibitorisch beeinflussen, einen Anstieg der intrazellulären PAH-Konzentration nachgewiesen. Analoge Untersuchungen an der basolateralen Membran proximaler Nierentubuluszellen müssten sich noch anschließen, um die Bedeutung anderer MDR-Proteine für den PAH-Transport aus der Zelle heraus zu beweisen bzw. zu widerlegen.

## **4.4 Beeinflussung der PAH-Akkumulation in menschlichem Nierenzellkarzinomgewebe durch Dexamethason und Triiodthyronin**

Wie bereits beschrieben, kann intaktes Nierengewebe der Ratte (FLECK, 1997) und des Menschen (FLECK et al., 1998) durch *in vitro* Einwirkung von Dexamethason angeregt werden, PAH verstärkt zu akkumulieren.

Die Untersuchungen der vorliegenden Studie zeigen eine interessante Möglichkeit einer additiven Hormontherapie bei der zytostatischen Behandlung des Nierenzellkarzinoms des Menschen auf. Durch Dexamethason- oder Triiodthyroningabe sollte versucht werden, in Nierenzellkarzinomgewebes eine Stimulation der Aufnahme von Fremdstoffen (Modellsubstanz PAH) zu erzeugen. Damit stellen die Versuche einen ersten Schritt zur Überwindung der MDR dar, auch wenn die dem PAH-Transport zugrunde liegenden Prozesse nicht mit denen für die MDR verantwortlichen Mechanismen identisch sind. Wichtig war uns, überhaupt nachzuweisen, ob und in welchem Ausmaß die Transportleistung im NZK-Gewebe einer hormonellen Regulation unterliegt. Folgende Ergebnisse sind in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung:

1. Sowohl in intaktem Nierengewebe als auch im Nierenzellkarzinomgewebe des Menschen kann die PAH-Akkumulationskapazität nach einer 24-stündigen Inkubation in Dexamethason-haltigem Williams E-Medium signifikant gesteigert werden. Im Gegensatz dazu übt Triiodthyronin keinen Einfluss auf die PAH-Anreicherung im Gewebe aus, weder in intaktem Nierengewebe noch in NZK-Gewebe des Menschen.
2. Erstaunlicherweise reagierten die Nierenzellkarzinomgewebeproben in unterschiedlicher Weise auf Dexamethason: In einer Gruppe (6 von 13 Patienten) der Tumorpatienten ließ sich die PAH-Aufnahme durch Dexamethason stimulieren. Sie wurden von uns als „Responder“ bezeichnet. In der anderen Gruppe, den sogenannten „Non Respondern“, war keine Stimulation des PAH-Transportes im Nierenzellkarzinomgewebes zu erkennen. Ein Zusammenhang zwischen Dexamethasonwirkung und Tumorstadium konnte aufgrund der relativ geringen Anzahl an Patienten nicht hergestellt werden.
3. Dexamethason scheint im Nierenzellkarzinomgewebe des Menschen eine höhere Wirksamkeit bezüglich der PAH-Aufnahme zu besitzen als in intaktem menschlichem Nierengewebe.

Eine Inkubation der Gewebeschnitte mit Dexamethason führt in „gesundem“ menschlichem Nierengewebe zu einer 1,5 fachen Steigerung der PAH-Akkumulation (FLECK et al., 1998). Überraschenderweise reagierte Nierenzellkarzinomgewebe der „Responder“ unter Dexamethasoneinfluss mit einer Steigerung der PAH-Anreicherung auf fast das Doppelte. Bei den „Non Respondern“ (7 von 13 Gewebeproben) konnte im Vergleich mit den Kontrollgruppen ohne Dexamethasonbehandlung keine signifikante Steigerung der PAH-Akkumulation gemessen werden.

Bereits in früheren Studien wurde gezeigt, dass Glukokortikoide das Tumorwachstum durch stimulierende Effekte auf die Wachstumskinetik des Gewebes beeinflussen können (CARD et al., 1970; TCHAO et al., 1968). In Nierenzellkarzinomgewebe konnten Glukokortikoidrezeptoren nachgewiesen werden (BOJAR et al., 1979). Die Existenz von „Respondern“ und „Non Respondern“ könnte mit der Anzahl an Glukokortikoidrezeptoren in den verschiedenen Gewebeproben in Zusammenhang stehen. Durch radioaktive Markierungsmethoden konnten BOJAR et al. (1979) nachweisen, dass nicht alle untersuchten Tumoren Glukokortikoidrezeptoren besitzen. In nur 10 von 15 menschlichen Nierenzellkarzinomen wurden Glukokortikoidbindungsstellen gefunden. Als Gründe dafür könnten die verschiedenen Zelltypen infrage kommen, von denen die Nierentumoren abstammen. Obwohl sich BOJAR et al. (1979) in ihren Untersuchungen nur auf endogene Glukokortikoide beziehen, ist anzunehmen, dass exogen zugeführte Glukokortikoide ebenso Wechselwirkungen mit vorhandenen Rezeptoren eingehen. Durch die vorliegende Studie wird ein zweiter Effekt von Dexamethason deutlich: neben der von BOJAR et al. (1979) in der Literatur beschriebenen wachstumsfördernden Wirkung auf das Nierenzellkarzinomgewebe durch Glukokortikoide haben diese einen stimulierenden Effekt auf die PAH-Akkumulationsfähigkeit der entarteten Zellen.

Allerdings sind auch gegenteilige Denkansätze in die Therapie des NZK berücksichtigt worden: in früheren Studien wurde einer Patientengruppe, die histologisch an einem metastasierenden, progressiven Nierenzellkarzinom erkrankt war, Dexamethason zugeführt, um eine „Down-regulation“ von Glukokortikoidrezeptoren und damit ein besseres Ansprechen auf Dexverapamil zu bewirken (MICKISCH, 1994a). Dexverapamil ist ein nebenwirkungsärmerer Chemosensitizer als Verapamil, der in Kombination mit dem Zytostatikum Vinblastin zur Behandlung des Nierenzellkarzinoms eingesetzt wurde, um die MDR zu durchbrechen (siehe Einleitung).

Eine andere Erklärung für die erhöhte Akkumulation von PAH in der NZK-Zellen der Dexamethason-„Respondern“ könnte in einer gesteigerten Synthese von PAH-Carrier-



proteinen liegen (FLECK et al., 1998). Diese Hypothese wird gegenwärtig im Rahmen einer weiteren Promotion am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FSU in Zusammenarbeit mit dem Physiologischen Institut der Universität Göttingen (Direktor: Prof. Dr. G. Burkhardt) untersucht. Erste Ergebnisse lassen vermuten, dass es tatsächlich zu einer gesteigerten Expression der mRNA, die für die Synthese von PAH-Carrierproteinen im NZK-Gewebe verantwortlich ist, zu kommen scheint (persönl. Mitteilung Dr. A. Bahn, Physiologisches Institut der Universität Göttingen). Ein weiterer Beleg für die Annahme, dass der Dexamethasoneffekt sich auf genomischer Ebene abspielt, ist das Fehlen akuter Hormoneffekte. In den „Akutversuchen“ dieser Arbeit kam es lediglich unter Einwirkung extrem hoher Dexamethasonkonzentrationen bei der Ratte zu einer Zunahme der PAH-Akkumulationskapazität. Derartig hohe Hormondosierungen sind für die Klinik ohne Relevanz; die „Stimulationseffekte“, die in den „Akutversuchen“ an der Ratte gemessen wurden, dürfen daher nicht überbewertet werden. Möglicherweise ist zum Zeitpunkt des eigentlichen Akkumulationsversuches, d.h. nach Umlagerung der Schnitte in Cross-Taggart-Medium nach vorheriger 2-stündiger Inkubation mit extrem hohen Dexamethasonkonzentrationen noch so viel Dexamethason in der Zelle enthalten, dass der Austransport von PAH kompetitiv verringert wird, zumal bekannt ist, dass PAH und Dexamethason gleiche Transportwege benutzen (ULLRICH et al., 1991).

Andererseits könnte die Stimulation der PAH-Aufnahme auch aus einer verbesserten Energiebereitstellung der Schnitte während des 24-stündigen Inkubationsversuches aufgrund der Anwesenheit von Dexamethason im Medium resultieren. Gegen diese Annahme spricht, dass weder der Glutathionstatus noch der Kaliumhaushalt der NZK-Zellen durch den Hormonzusatz signifikant verändert wird. Somit dürften auch anabole Dexamethasoneffekte für die Verbesserung der PAH-Akkumulation in NZK-Zellen nicht verantwortlich sein.

Die Stimulation des PAH-Transportes in den „Responder“-Gewebeproben durch Inkubation mit Dexamethason könnte möglicherweise nur in frühen Tumorstadien des Nierenzellkarzinoms auftreten. Im Patientengut dieser Studie handelte es sich bei den Respondern um klarzellige Nierenzellkarzinome, deren Tumorgröße mit dem Stadium pT<sub>2</sub> korrelierten, also eine Größe von > 7 cm aufwiesen, aber noch auf eine Niere beschränkt waren. Nur bei einem „Responder“ (Patient 14) wurde histologisch eine Tumordinvasion in das benachbarte Fettgewebe diagnostiziert (pT<sub>3a</sub>). Alles in allem ist eine Zuordnung des Ausmaßes der Dexamethasonwirkung zum Schweregrad des NZK aufgrund der

relativ geringen Fallzahl nicht möglich. Prinzipiell wird die Möglichkeit eines derartigen Zusammenhanges allerdings durch TOBE et al. (1995) diskutiert: Sie zeigten Korrelationen zwischen P-Glykoproteinkonzentration im NZK und seinem histopathologischen Differenzierungsgrad: Der P-Glykoproteingehalt in wenig differenzierten renalen klarzelligen Tumoren ist niedriger als in höher differenzierten Tumoren der Niere. Somit besteht offenbar ein inverser Zusammenhang zwischen Malignitätsgrad und Ausprägung der MDR im NZK. Im Gegensatz zu dieser Beobachtung stehen Untersuchungen, in denen gefunden wurde, dass in Nierenzellkarzinomgewebe sogar ein geringerer Pgp-Gehalt als in angrenzendem gesundem Nierengewebe vorhanden ist (NISHIYAMA et al., 1993), wobei in den Veröffentlichungen der meisten Autoren die erstgenannten Ergebnisse von TOBE et al. (1995) reproduziert werden konnten.

Wie schon in früheren Untersuchungen an Nierenrindenschnitten der Ratte und an gesundem Nierengewebe des Menschen (FLECK et al., 1998) gezeigt wurde, wird durch  $T_3$ -Zusatz zum Inkubationsmedium auch im Nierenzellkarzinomgewebe des Menschen keine Stimulation der PAH-Akkumulation erzielt. Die Schnitt-Medium-Quotienten liegen unter 1, d.h., dass entweder die PAH-Auswärtstransportvorgänge stimuliert worden sind bzw. dass eine Reduktion des PAH-Eintransportes nach Inkubation in  $T_3$ -haltigem Medium eingetreten sein muss. Ein weitere Ursache dieses Effektes könnte in der katabolen Wirkung von  $T_3$  liegen.  $T_3$  steigert möglicherweise das sogenannte „house-keeping“ der Tubuluszellen, d.h. die Aufnahme energiereicher Substrate, z. B. Aminosäuren (FOULKES und BLANCK, 1990), wodurch die intrazellulären Energiereserven aufgebraucht werden würden und somit nicht genügend ATP für den PAH-Transport zur Verfügung stünde. Bei Ratten ist der metabolische Einfluss des  $T_3$  als Ursache für einen gesteigerten Energieverbrauch vermutet worden (FLECK et al., 1998), so dass die PAH-Akkumulation sinkt, was schon in anderen Versuchen für die renale Reabsorption von Aminosäuren nach  $T_3$  Vorbehandlung gezeigt wurde (FLECK et al., 1997a).

## **4.5 Ausblick: Welche therapielevanten Ansätze könnten sich aus den vorliegenden Untersuchungen ergeben?**

Hauptaugenmerk in der medikamentösen Therapie des Nierenzellkarzinoms stellt die Überwindung des MDR-Phänomens dar (s. 1.4). Auf ursächliche Zusammenhänge, die

den Phänotyp der MDR determinieren, soll im folgenden nochmals eingegangen werden.

TOBE et al. (1995) fanden, wie bereits erwähnt, heraus, dass die MDR mit geringer werdendem Differenzierungsgrad des Nierenzellkarzinomgewebes abnimmt. Somit müssten eigentlich ein hochmalignes NZK besser auf eine Chemotherapie ansprechen als vergleichsweise gutartige Tumoren – ein Zusammenhang, der sich unseres Wissens nach in praxi nicht bestätigen ließ. CHAPMAN und GOLDSTEIN (1995) begründeten den Mechanismus von NZK-Gewebe mit geringerem Differenzierungsgrad, eine Medikamentenresistenz zu entwickeln, damit, dass andere Transportproteine exprimiert werden, die Tumorsuppressorgenfunktion verlorengelassen sowie Genmutationen und Translokationen erfolgen, die ein metastatisches Wachstum, Gefäßeinbrüche oder das Ausbleiben des programmierten Zelltodes (= Apoptose) erlauben.

In der Literatur haben auch andere Autoren die Zusammenhänge zwischen Expression des P-Glykoprotein und Tumorgrad, Wachstumsmuster und Differenzierungsgrad proximaler Nierenzellkarzinomzellen mittels immunhistochemischer Methoden beschrieben (Northern blot-Analysen unter Verwendung verschiedener Antikörper [C 219, H241, JSB1]). HOFMOCKEL et al. (1997) sowie KANAMARU et al. (1989) stellten ebenfalls fest, dass der P-Glykoproteingehalt in gut differenzierten Tumoren höher als in weniger differenzierten ist. Weiterhin vertreten sie die Meinung, dass der hohe MDR1-Gehalt in renalen Adenokarzinomen aus der bereits relativ hohen Expression dieses Transporters in normalem Nierengewebe resultiert, von denen diese abstammen. Durch den gleichzeitigen Einsatz mehrerer Antikörper lässt sich in über 90 % der Nierenzellkarzinome P-Glykoprotein nachweisen (VAN KALKEN et al., 1991). Apikale Immunfärbungen des MDR-Transporters konnten in gut differenzierten Anteilen von Nierenzellkarzinomen beobachtet werden, wohingegen klarzellige, schlechter differenzierte Tumoren eine schwächere Färbung aufwiesen (MICKISCH et al., 1991c, 1992, 1993). Korrelationen zwischen Tumorstadium und MDR-Transporterkonzentration konnten jedoch nicht festgestellt werden.

Zu folgenden Ergebnissen kamen CHAPMAN und GOLDSTEIN (1995): Metastasen von Nierenzellkarzinomen weisen höhere P-Glykoproteinkonzentrationen auf als die Primärtumoren. Der Pgp-Gehalt in frühen Tumorstadien von klarzelligen Tumoren ist geringer als in Tumoren, die schon in das benachbarte Gewebe infiltriert sind bzw. metastasiert haben. Die ansteigende Aktivität der MDR-Transporter bei zunehmender biologischer Aggressivität könnte mit Veränderungen der Proto-Oncogene bzw. der Tumor-

Suppressor-Gene in Zusammenhang stehen (CHIN et al., 1992). TOBE et al. (1995) versuchten die Diskrepanz der o.g. Befunde zu erklären, indem sie von einer zweiphasigen Reaktion der MDR1-Expression in Nierenzellkarzinomen ausgehen, die von Pgp-reichen Nierengewebe abstammen: Sinkender MDR1-Gehalt bei beginnender Entdifferenzierung und Wiederanstieg der Pgp-Konzentration, wenn das Karzinomgewebe zu metastasieren beginnt.

ROCHLITZ et al. (1992) beschrieben Zusammenhänge zwischen Differenzierungsgrad des Tumors und P-Glykoproteinexpression. Sie verwendeten dafür eine modifizierte Klassifikation nach ZOLLINGER und MIHATSCH (1978):

- klarzelliges Karzinom (Grad 1, 2, 3)
- anaplastisches Karzinom
- tubuläres (Granularzell-) Karzinom und
- Onkozytom.

Je intensiver die Färbung mittels des Antikörpers (C 219) gegen Pgp war, um so höher differenziert war der klarzellige Karzinomtyp. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass im anaplastischen Karzinom so gut wie kein P-Glykoprotein exprimiert wird (CHAPMANN und GOLDSTEIN, 1995). ROCHLITZ et al. (1992) fanden entgegen allen Erwartungen, dass im hochdifferenzierten Onkozytom ein geringerer MDR1-Gehalt vorhanden ist als im weniger differenzierten klarzelligen Karzinom. Eine Erklärung dafür könnte die Hypothese liefern, wonach sich die Herkunft der Zellen der Onkozytome von denen der klarzelligen Karzinome unterscheidet (HARTWICK et al., 1992), wobei letztere von proximalen Nierentubuluszellen abstammen. Ein hoher Pgp-Gehalt dieser Zellen wurde, wie bereits erwähnt, mehrfach beschrieben (TOBE et al., 1995). KAKEHI et al. (1988) sowie NAITO et al. (1993) konnten keine spezifischen Korrelationen zwischen MDR1-Gehalt und histopathologischen Zelltyp herausfinden. Die Expression von Pgp in Nierenzellkarzinomgewebe ist ein bedeutender Faktor für die intrinsische Vielfachresistenz (BAK et al., 1990; NAITO et al., 1993). HOFMOCKEL et al. (1997) korrelierten den MDR1-Gehalt mit der Überlebensprognose. Überraschenderweise ist eine hohe Expressionsrate an MDR1 verbunden mit einer besseren Prognose für die Therapie des Nierenzellkarzinoms. Im Gegensatz dazu fanden DUENSING et al. (1994) in ihren Untersuchungen unter Verwendung des Antikörpers C 219 eine längere progressionsfreie Überlebenszeit bei Patienten mit NZK, deren MDR1-Gehalt nahezu gegen Null tendierte oder sehr gering war (< 1 %).

Allerdings wird die MDR des Tumors nicht ausschließlich durch den MDR1-Gehalt determiniert (BAK et al., 1990; NAITO et al., 1993; VAN KALKEN et al., 1991). Unter 1.3.3 wurden schon weitere biochemisch und molekularbiologisch definierte Faktoren beschrieben, die zur Ausbildung des MDR-Phänomens führen. Diese Erkenntnisse über das Zusammenspiel verschiedener Faktoren bei der Entstehung der MDR des NZK stehen in Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und könnten als Begründung der unterschiedlichen Dexamethasoneffekte bei „Respondern“ und „Non Respondern“ herangezogen werden.

Eine offene Frage bleibt allerdings, inwieweit sich der aktive Transport des Anions PAH mit der Aufnahme der oft neutralen/basischen und stark lipophilen Zytostatika in die Zellen des NZK vergleichen lässt. Es ist erwiesen, dass Zytostatika nur in geringem Maße die selben Carrier in der Nierenzelle benutzen, die für den PAH-Transport zuständig sind (ULLRICH, 1999). Wie dem auch sei, der prinzipielle Nachweis einer Steigerung der Fremdstoffaufnahme in Nierenzellkarzinomgewebe ist zumindest ein weiterer Denkansatz zur Überwindung der MDR. Ähnliche Überlegungen spiegeln sich in zahlreichen Studien wider, die mit dem Ziel der Überwindung der MDR bei in der Behandlung des Nierenzellkarzinoms durchgeführt wurden.

Wenn es möglich wäre, die Aufnahme von Medikamenten in das Nierenzellkarzinomgewebe unter *in vivo*-Bedingungen zu erhöhen, wäre eine Steigerung der Akkumulation von Zytostatika sowohl im NZK als auch in seinen Metastasen denkbar und würde damit die Effektivität einer Chemotherapie deutlich erhöhen. Allerdings könnte dieser positive Effekt, den wir durch Dexamethason auslösen konnten, durch eine gleichzeitige Stimulation der Expression von Pgp einen gesteigerten Auswärtstransport der Zytostatika aus der Zelle zur Folge haben. Deshalb wird in zahlreichen Untersuchungen nach Wegen gesucht, die intrinsische oder die nach einer Behandlung mit zytotoxischen Medikamenten erworbene MDR zu durchbrechen. Auf die verschiedenen Strategien der Chemosensitivierung wurde bereits im Abschnitt 1.4 ausführlich eingegangen. Ein völlig neuartiger Therapieansatz könnte in der Kombination der unter 1.4 genannten Chemosensitizer mit den von uns getesteten Pharmaka bestehen, wodurch im Idealfall der Eintransport von Zytostatika verbessert und ihr Austransport gehemmt werden würde. Ergänzende Therapiestrategien ergeben sich aus Untersuchungen an Nierenzellkarzinomgewebe durch FRANK und POMMER, 1999, die Zusammenhänge zwischen MDR1-Phänotyp und Wirksamkeit von Zytostatika bei gleichzeitiger Gabe von IFN $_{\alpha 2b}$

aufgezeigt haben. Die Autoren vermuten, dass die Sekretion von IFN<sub>α2b</sub>, welches anti-proliferative Cytokine induziert, einen Pgp-vermittelten Transport erfordert und dass der IFN<sub>α2b</sub>-vermittelte wachstumshemmende Effekt mit der Pgp-Expression korreliert.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurden die Effekte von Dexamethason auf die Akkumulationsfähigkeit für PAH in Nierenzellkarzinomgewebe des Menschen untersucht. Dabei zeigte sich eine Stimulation der PAH-Anreicherung in ca. 50% der Fälle („Responder“). Der Ursache dieses Phänomens wird z.Z., wie bereits erwähnt, in PCR-Untersuchungen nachgegangen. Es bleibt zu klären, ob das Stimulationsphänomen nach Inkubation in Dexamethason-haltigem Medium *in vitro* Folge einer gesteigerten Neusynthese von PAH-Carrierprotein ist, worauf schon frühere Untersuchungen hingewiesen hatten (ORTWEILER et al., 1987), oder ob aufgrund verbesserter Energiebereitstellung in den Nierenrindenschnitten (Aufrechterhaltung der intrazellulären K<sup>+</sup>- und Glutathionkonzentration; s. **Tabelle 6**) die tubuläre Transportleistung verbessert wird. Ein letzter Aspekt ist ebenfalls zu berücksichtigen: Dexamethason ist auch Substrat des MDR1-Transporters (SCHINKEL et al., 1995). Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass Dexamethason mit dem Transportprotein interagiert, das auch PAH aus den Tubuluszellen heraustransportiert (ULLRICH, 1999). Da es jedoch bei den „Respondern“ zu einer beträchtlichen Zunahme der PAH-Akkumulation kommt, ist die Beeinflussung des MDR1-Transporters entweder von untergeordneter Bedeutung oder sie wird durch die Dexamethason-vermittelte Stimulation der PAH-Aufnahmeprozesse maskiert.

Wie mehrfach erwähnt, ist das fortgeschrittene NZK ein Tumor, der eine extreme Resistenz gegenüber jeglicher zytostatischer Therapie aufweist (SAMUELS et al., 1997). Betrachtet man die Befunde der vorliegenden Arbeit aus klinischer Sicht, ist daher zu beachten, dass hochdosierte Dexamethasongaben im Rahmen der medikamentösen Therapie eines NZK zu einer Beeinträchtigung verschiedener Stoffwechselfunktionen im Organismus führen könnten. Ebenso könnten die Wirkungen der Zytostatika bei gleichzeitiger Gabe von Dexamethason auf gesundes Gewebe verstärkt sein. Somit muss abschließend kritisch eingeschätzt werden, dass es zwar prinzipiell möglich ist, durch Dexamethason die PAH-Aufnahme in die Zellen eines Nierenzellkarzinoms, zumindest bei etwa der Hälfte der Patienten *in vitro* zu steigern, aber es sind weiterführende Versuche nötig um abzuklären, ob auch die Aufnahme von Zytostatika in das NZK *in vitro*

und v.a. *in vivo* hormonell gesteigert werden kann, ohne dass die hormonbedingten Nebenwirkungen eine zusätzliche Belastung des Patienten darstellen.

## 5 Zusammenfassung

In vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich die Akkumulationsfähigkeit für p-Aminohippursäure (PAH) im Nierengewebe von Ratte und Mensch nach *in vitro*-Stimulation mit Dexamethason, nicht aber mit  $T_3$ , stimulieren lässt. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob auch in menschlichen Nierenzellkarzinomen (NZK) die Akkumulationskapazität gesteigert werden kann. Gelänge dies, wäre damit eventuell eine neue Möglichkeit gegeben, die Fremdstoffkonzentration, z.B. die von Zytostatika, in der Tumorzelle zu erhöhen und damit vor allem die Abheilung der Metastasen eines NZK zu begünstigen, die für ihre hochgradige multidrug resistance (MDR) bekannt sind. Menschliches Nierengewebe wurde im Rahmen einer Tumornephrektomie in der Klinik für Urologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena bei 32 Patienten gewonnen.

Zur Optimierung des Versuchsansatzes wurden Voruntersuchungen an Nierengewebe der Ratte durchgeführt. In den sog. Akutversuchen (2 Stunden,  $O_2$ -Begasung, Cross-Taggart-Medium) wurde die PAH-Akkumulationsfähigkeit von frisch entnommenem Nierengewebe bestimmt. Als Maß der PAH-Aufnahme diente der Schnitt-Medium-Quotient ( $Q_{S/M}$ ), der die Relation der PAH-Konzentrationen im Gewebe zu der im Inkubationsmedium wiedergibt. Der Schwerpunkt der Arbeit lag auf den sog. Langzeitversuchen, in denen die Nierenrindenschnitte in Williams E-Medium, das Dexamethason bzw.  $T_3$  enthielt, unter Carbogenbegasung 24 Stunden inkubiert wurden. Anschließend wurde, analog zu den Akutversuchen, die PAH-Akkumulation bestimmt. Die Funktionstüchtigkeit der Nierenrindenschnitte nach 24-stündiger Inkubation ließ sich durch Messung der intrazellulären Konzentrationen an Kalium und Glutathion (GSH, GSSG) verifizieren.

Für die Ratten konnten Ergebnisse früherer Untersuchungen bestätigt werden: nach 24-stündiger Inkubation mit Dexamethason kommt es zu einer signifikanten Zunahme der PAH-Akkumulationsfähigkeit (133%). Dagegen führt die Langzeitinkubation mit  $T_3$  zu einer signifikanten Abnahme der PAH-Aufnahme in das Nierengewebe.

In intaktem menschlichen Nierengewebe wird PAH weniger effektiv als bei der Ratte angereichert (niedrigere  $Q_{S/M}$ ). NZK-Gewebe ist überhaupt nicht in der Lage, PAH aktiv zu akkumulieren ( $Q_{S/M} < 1$ ). Als Gründe hierfür kommen in Betracht, dass das NZK



aufgrund seiner Abstammung von Zellen des Sammelrohres PAH a priori nicht akkumulieren kann bzw. wegen des Vorhandenseins einer Vielzahl sog. Multidrug Resistance Proteins im NZK ein beschleunigter Austransport des aufgenommenen PAH stattfindet.

Sowohl in intaktem Nierengewebe als auch im NZK-Gewebe des Menschen kann die PAH-Akkumulationskapazität nach einer 24-stündigen Inkubation mit Dexamethason signifikant gesteigert werden. Glukokortikoide haben somit einen stimulierenden Effekt auf die PAH-Akkumulationsfähigkeit, speziell in den maligne entarteten Nierenzellen. Hier hat Dexamethason sogar eine höhere Wirksamkeit bezüglich der PAH-Aufnahme als in intaktem menschlichem Nierengewebe (1,9- vs. 1,5-fache Zunahme der PAH-Akkumulation).

Überraschender Weise reagiert das NZK-Gewebe der einzelnen Patienten unterschiedlicher auf Dexamethason: bei einigen Patienten (6/13) ließ sich die PAH-Aufnahme durch Dexamethason deutlich stimulieren („Responder“). Bei den übrigen Patienten (7/13, „Non Responder“) war keine Stimulation des PAH-Transportes im NZK nachweisbar. Die Unterteilung in „Responder“ und „Non Responder“ könnte mit der Anzahl an Glukokortikoidrezeptoren in Zusammenhang stehen, da in der Literatur beschrieben wurde, dass nicht alle NZK Glukokortikoidrezeptoren exprimieren.

Ein Zusammenhang zwischen Dexamethasonwirkung und Tumorstadium konnte aufgrund der relativ geringen Patientenzahl nicht hergestellt werden. Prinzipiell wird die Möglichkeit eines derartigen Zusammenhanges allerdings im Schrifttum diskutiert, zumindest existiert eine inverse Korrelation zwischen der Konzentration an P-Glykoprotein im NZK und seinem histopathologischen Differenzierungsgrad.

Eine aktive PAH-Aufnahme in die Tubuluszelle ist erwartungsgemäß nur bei ausreichender Energiebereitstellung möglich. Inkubationsversuche unter anaeroben Bedingungen ( $N_2$ -Begasung) zeigten, dass in allen Geweben und unter allen Versuchsbedingungen die  $Q_{S/M}$ -Werte bei ca. 1 lagen.

Im Gegensatz zu Dexamethason übt  $T_3$ , wie auch bei der Ratte, keinen stimulierenden Einfluss auf die PAH-Anreicherung aus, weder in intaktem Nierengewebe noch in NZK-Gewebe des Menschen.  $T_3$  steigert möglicherweise das sogenannte „house-keeping“ der Tubuluszellen, d.h. die Aufnahme energiereicher Substrate an der basolateralen Membran, wodurch die intrazellulären Energiereserven aufgebraucht würden und somit nicht genügend ATP für den PAH-Transport zur Verfügung stünde.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass zwar durch Dexamethason-Vorbehandlung *in vitro* prinzipiell eine Zunahme der Fremdstoffaufnahme im NZK-Gewebe möglich ist. Ob mit dieser Therapiestrategie auch die Anreicherung von Zytostatika *in vivo* gesteigert werden kann bzw. inwieweit Dexamethason in pharmakologischer Dosierung auch den Austransport von Zytostatika aus der Tumorzelle stimuliert, muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- ASHER AL, MULE JJ, KASID A, RESTIFO NP, SALO JC, REICHERT CM, JAFFE G, FENDLY B, KRIEGLER M, ROSENBERG SA (1991):  
Murine tumor cells transduced with the gene for tumor necrosis factor- $\alpha$ . Evidence for paracrine immune effects of tumor necrosis factor against tumors.  
J. Immunol. 146, 3227-3234
- BAK M jr, EFFERTH T, MICKISCH G, MATTERN J, VOLM M (1990):  
Detection of drug resistance and P-glycoprotein in human renal cell carcinomas.  
Eur. Urol. 17, 72-75
- BANNASCH P, HACKER HJ, TSUDA H, ZERBAN H (1986):  
Aberrant regulation of carbohydrate metabolism and metamorphosis during renal carcinogenesis.  
Adv. Enzyme Regul. 25, 279-296
- BANNASCH P, NOGUEIRA E, ZERBAN H (1989):  
Zytologie und Zytogenese experimenteller epithelialer Nierentumoren.  
Verh. Dtsch. Ges. Path. 73, 301-313
- BERGWERK AJ, SHI X, FORD AC, KANAI N, JACQUEMIN E, BURK RD, BAI S, NOVIKOFF PM, STIEGER B, MEIER PJ, SCHUSTER VL, WOLKOFF AW (1996):  
Immunologic distribution of an organic anion transport protein in rat liver and kidney.  
Amer. J. Physiol. 271, G231-G238
- BERKHIN EB, VARSHAVSKY BY (1975):  
Substrate induction of tubular secretion of organic compounds in the kidney.  
Proc. Acad. Sci. USSR 220, 1463-1466
- BERNDT WO (1989):  
Potential involvement of renal transport mechanisms in nephrotoxicity.  
Toxicol. Lett. 46, 77-82
- BESSEGHIR K, ROCHEL-RAMEL F (1987):  
Renal excretion of drugs and other xenobiotics.  
Ren. Physiol. 10, 221-241
- BÖHME M, BÜCHLER M, MÜLLER M, KEPPLER D (1993):  
Differential inhibition by cyclosporins of primary-active ATP-dependent transporters in the hepatocyte canalicular membrane.  
FEBS Lett. 333, 193-196

- BOJAR H, MAAR K, STAIB W (1979):  
The endocrine background of human renal cell carcinoma. IV. Glucocorticoid receptors as possible mediators of progestogen action.  
Urol. Int. 34, 330-338
- BORST P (1991):  
Genetic mechanisms of drug resistance.  
Acta Oncol. 30, 87-105
- BORST P, KOOL M, EVERS R (1997):  
Do cMOAT (MRP2), other MRP homologues, and LRP play a role in MDR?  
Semin. Cancer Biol. 8, 205-213
- BRATTON AC, MARSHALL EK (1939):  
A new coupling component for sulfonamide determination.  
J. Biol. Chem. 128, 537-550
- BRÄUNLICH H (1981):  
Excretion of drugs during postnatal development.  
Pharmacol. Ther. 12, 299-320
- BRÄUNLICH H (1984):  
Postnatal development of kidney function in rats receiving thyroid hormones.  
Exp. Clin. Endocrinol. 83, 243-250
- BRÄUNLICH H (1985):  
Postnatal development and inducibility of renal tubular transport processes in rats.  
Int. J. Pediatr. Nephrol. 6, 177-182
- BRÄUNLICH H (1987):  
Transport of p-aminohippurate in renal cortical slices of rats of different ages following treatment with thyroid hormones.  
Biomed. Biochem. Acta 46, 251-257
- BRÄUNLICH H (1988):  
Hormonal control of postnatal development of renal tubular transport of weak organic acids.  
Pediatr. Nephrol. 2, 151-155
- BRÄUNLICH H, KERSTEN L (1972):  
Die Entwicklung der renalen Ausscheidung von Natrium und Kalium in der postnatalen Periode bei der Ratte.  
Acta Biol. Med. Germ. 28, 89-98
- BRÄUNLICH H, KÖHLER A, SCHMIDT I (1986):  
Acceleration of p-aminohippurate excretion in immature rats by dexamethasone treatment.  
Med. Biol. 64, 267-270

- BRÄUNLICH H, JAHN F, BARTHA J (1987):  
Hemodynamic parameters and renal blood flow following stimulation of renal tubular transport processes by treatment with thyroid hormones.  
Pharmazie 42, 846-848
- BRÄUNLICH H, RÖSSLER S, GERHARDT C (1993):  
Influence of sympathetic nervous system on dexamethasone-stimulated renal tubular transport of p-aminohippurate in young rats.  
Dev. Pharmacol. Ther. 20, 86-92
- BÜCHLER M, KÖNIG J, BROM M, KARTENBECK J, SPRING H, HORIE T, KEPPLER D (1996):  
cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats.  
J. Biol. Chem. 271, 15091-15098
- BUGERT P, KOVACS G (1996):  
Molecular differential diagnosis of renal cell carcinomas by microsatellite analysis.  
Amer. J. Pathol. 149, 2081-2088
- BURCKHARDT G, PORTH J, WOLFF NA (1998):  
Functional and molecular characterization of renal transporters for p-aminohippurate (PAH).  
Nova Acta Leopoldina NF 78, Nr. 306, 35-40
- CAPASSO G, DE SANTO NG, KINNE R (1987):  
Thyroid hormones and renal transport: Cellular and biochemical aspects.  
Kidney Int. 32, 443-451
- CARD DJ, KOHORN EJ, LYTON B (1970):  
Effects of hormones on whole organ cultures of renal cell carcinoma.  
Surg. Forum 21, 532-533
- CARROLL PR, MURTY VVS, REUTER V (1987):  
Abnormalities at chromosome region 3p 12-14 characterize clear cell renal carcinoma.  
Cancer Genet. Cytogenet. 26, 253-259
- CHAMBERS TC, MC AVOY EM, JACOBS JW, EILON G (1990):  
Protein kinase C phosphorylates P-glycoprotein in multidrug resistant human carcinoma cells.  
J. Biol. Chem. 265, 7679-7686
- CHAPMAN AE, GOLDSTEIN LJ (1995):  
Multiple drug resistance: Biologic basis and clinical significance in renal cell carcinoma.  
Sem. in Oncol. 22, 17-28

- CHIN KV, UEDA K, PASTAN I, GOTTESMAN MM (1992):  
Modulation of the activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53.  
Science 255, 459-462
- COHEN C, Mc CUE PA, DEROSE PB (1988):  
Histogenesis of renal cell carcinoma and renal oncocytoma: an immunohistochemical study.  
Cancer 62, 1946-1951
- COLE SPC, BHARDWAJ G, GERLACH JH, MACKIE JE, GRANT CE, ALMQUIST KC, STEWARD AJ, KURZ EU, DUNCAN AMV, DEELEY GG (1992):  
Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line.  
Science 258, 1650-1654
- COLOMBO MP, FERRARI G, STOPPACIARO A, PARENZA M, RODOLFO M, MAVILIO F, PARMIANI G (1991):  
Granulocyte colony stimulating factor gene transfer suppresses tumorigenicity of a murine adenocarcinoma in vivo.  
J. Exp. Med. 173, 889-897
- CUI Y, KÖNIG J, BUCHHOLZ U, SPRING H, LEIER I, KEPPLER D (1999):  
Drug resistance and ATP- dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells.  
Mol. Pharmacol. 55, 929-937
- DE JONG B, OOSTERHUIS JW, IDENBURG VJ, CASTEDO SM, DAM A, MENSINK HJ (1988):  
Cytogenetics of 12 cases of renal adenocarcinoma.  
Cancer. Genet. Cytogenet. 30, 53-61
- DE NAYER P (1987):  
Thyroid hormone action at the cellular level.  
Hormone Res. 26, 48-57
- DHAINAUT A, REGNIER G, ATASSI G, PIERRE A, LEONCE S, KRAUS-BERTHIER L, PROST JF (1992):  
New triazine derivatives as potent modulators of resistance.  
J. Med. Chem. 35, 2481-2496
- DUENSING S, DALLMANN I, GROSSE J, BUER J, LOPEZ-HANNINEN E, DEKERT M, STORKEL S, KIRCHNER H, POLIWODA H, ATZPODIEN J (1994):  
Immunocytochemical detection of P-glycoprotein: initial expression correlates with survival in renal cell carcinoma patients.  
Oncology 51, 309-313

- EFFERTH T, VOLM M (1992a):  
Expression of protein kinase C in human renal cell carcinoma cells with inherent resistance to doxorubicin.  
Anticancer Res. 12, 2209-2212
- EFFERTH T, VOLM M (1992b):  
Immunocytochemical detection of oncoproteins in animal and human tumor lines with acquired or inherent multidrug resistance.  
Cancer Detect. Prev. 16, 237-243
- EFFERTH T, DUNN TA, BERLION M, LANGENBAHN H, POMMERENKE EW, VOLM M (1993):  
Reversal of inherent multidrug-resistance in primary human renal cell carcinoma cell cultures by S 9788.  
Anticancer Res. 13, 905-908
- EFFERTH T, FABRY U, OSIEKA R (1995):  
Is there a realistic chance for the clinical modulation of multidrug resistance?  
Onkologie 18, 258-260
- ENDICOTT JA, LING V (1989):  
The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance.  
Ann. Rev. Biochem. 58, 137-171
- EVERS R, ZAMAN GPJ, VAN DEEMTER L, JANSEN H, CALAFAT J, OOMEN LCJM, OUDE ELFERINK RPJ, BORST P, SCHINKERL AH (1996):  
Basolateral localization and export activity of the human multidrug resistance-associated protein in polarized pig kidney cells.  
J. Clin. Invest. 97, 1211-1218
- EVERS R, KOOL M, VAN DEEMTER L, JANSSEN H, CALAFAT J, OOMEN LC, PAULUSMA CC, OUDE ELFERINK RP, BAAS F, SCHINKEL AH, BORST P (1998):  
Drug export activity of the human canalicular multispecific organic anion transporter in polarized kidney MDCK cells expressing cMOAT (MRP2) cDNA.  
J. Clin. Invest. 101, 1310-1319
- FANESTIL DD, PARK CS (1981):  
Steroid hormones and the kidney.  
Rev. Physiol. 43, 637-649
- FLECK C (1997):  
In vitro-stimulation of renal tubular p-aminohippurate transport by dexamethasone in kidney tissue of immature and adult rats.  
Exp. Toxic. Pathol. 49, 487-492

- FLECK C, BRÄUNLICH H (1990):  
Age dependent differences in stimulation and compensation of renal and biliary transport processes. Correlation to the physicochemical properties of the excreted substances.  
Arzneimittelforsch. – Drug Res. 40, 1047-1053
- FLECK C, BRÄUNLICH H (1995):  
Renal handling of drugs and amino acids after impairment of kidney or liver function – influences of maturity and protective treatment.  
Pharmac. Ther. 67, 53-77
- FLECK C, PERTSCH J (1998):  
Epidermal growth factor (EGF) increases the renal amino acid transport capacity in amino acid loaded rats.  
Amino Acids 15, 307-320
- FLECK C, AURICH M, SCHWERTFEGER M (1997a):  
Stimulation of renal amino acid reabsorption after treatment with triiodothyronine or dexamethasone in amino acid loaded rats.  
Amino Acids 12, 265-279
- FLECK C, GÖCKERITZ S, SCHUBERT J (1997b):  
Tubular PAH transport capacity in human kidney tissue and in renal cell carcinoma: correlation with various clinical and morphological parameters of the tumor.  
Urol. Res. 25, 167-171
- FLECK C, KRATOCHWIL E, WINTERSTEIN K, GÖCKERITZ S, SCHUBERT J (1998):  
In vitro stimulation of renal tubular p-aminohippurate transport by dexamethasone in rat kidneys and in intact kidney tissue of patients suffering from renal cell carcinoma.  
Urol. Res. 26, 143-148
- FLECK C, BACHNER B, GÖCKERITZ S, KARGE E, STROHM U, SCHUBERT J (2000):  
Ex vivo stimulation of renal tubular p-aminohippurate transport by dexamethasone and triiodothyronine in human renal cell carcinoma.  
Urol. Res. 28, 383-390
- FOJO AT, SHEN DW, PASTAN I, GOTTESMAN MM (1987):  
Intrinsic drug resistance in kidney cancers is associated with expression of a human multidrug resistance gene.  
J. Clin. Oncol. 5, 1922-1927
- FOULKES EC, BLANCK S (1990):  
Site of uptake of nonfiltered amino acids in rabbit kidney.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 193, 56-60



FRANK MH, POMMER S (1999):

Interferon  $\alpha 2b$  differentially affects proliferation of two human renal cell carcinoma cell lines differing in the P-glycoprotein-associated multidrug-resistance phenotype.

J. Cancer Res. Clin. Oncol. 125, 117-120

GANSBACHER B, ZIER K, DANIELS B, CRONIN K, BANNERJI R, BALBOA E (1990):

Interleukin-2 gene transfer into tumor cells abrogates tumorigenicity and induces protective immunity.

J. Exp. Med. 172, 1217-1224

GIEBISCH G, MALNIC G, BERLINER RW (1996):

Control of renal potassium excretion.

In: BRENNER BM (Hrsg.): The kidney. 5.Aufl., Bd.1, Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokio, S. 371-407

GLOFF CA, MAMELOK RD, BENET LZ (1988):

Organic anion transport by basal-lateral membranes: effect of PAH and furosemide on each other's transport.

Pharmacology 37, 268-276

GOTTESMAN MM, PASTAN I (1988):

The multidrug transporter, a double-edged sword.

J. Biol. Chem. 263, 12163-12166

GOTTESMAN MM, PASTAN I (1993):

Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter.

Ann. Rev. Biochem. 62, 385-427

GOTTESMAN MM, HORIO M, HANDLER J, RAVIV Y, GALSKI H, MICKISCH GH, MERLINO G, WILLINGHAM W, PASTAN I (1990):

Function of the multidrug transporter.

In: SUGANO H, TSURUO T (Hrsg.): Drug resistance as a biochemical target in cancer chemotherapy. BMS symposium on cancer research, Vol. 13.

Academic Press, San Diego

GOTTESMAN MM, MICKISCH GH, PASTAN I (1994):

In vivo models of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance.

In: GOLDSTEIN L, OZOLS R (Hrsg.): Anticancer drug resistance.

Kluwer, Norwell, Massachusetts USA, S. 103

GRANATA P, PORTENTOSO P, MINELLI E, RIGHI R, MERONI E, BONO A, POZZI E, SALVADORE M, SIMI P, CASALONE R (1992):

Clonal chromosome changes in RCC.

Cancer Genet. Cytogenet. 64, 30-34

GRÜNDEMANN D, BABIN-EBELL J, MARTEL F, ÖRDING N, SCHMITT A, SCHÖMIG E (1997):

Primary structure and functional expression of the apical organic cation transporter from rat kidney epithelial LLC-PK1 cells.  
J. Biol. Chem. 272, 10408-10413

HAGENBUCH B, ECKHARDT U, NOË B, STIEGER B, MEIER PJ (1998):

Multispecific hepatocellular bile salt and organic anion uptake systems.  
Nova Acta Leopoldina NF 78, Nr. 306, 129-133

HANJONG A, EUNSIK L, KWANGHOON K, CHONGWOOK L (1994):

Effect of glutathione and its related enzymes on chemosensitivity of renal cell carcinoma and bladder carcinoma cell lines.  
J. Urol. 151, 263-267

HARTWICK RWJ, EL- NAGGAR AK, RO JY, SRIGLEY JR, Mc LEMORE DD, JONES EC, GRIGNON DJ, THOMAS J, AYALA A (1992):

Renal oncocytoma and granular renal cell carcinoma. A comparative and clinicopathologic and DNA flow cytometric study.  
Am. J. Clin. Pathol. 98, 587-593

HISSIN PJ, HILF R (1976):

A fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues.  
Anal. Biochem. 74, 214-226

HOFMOCKEL G, BASSUKAS ID, WITTMANN A, DÄMMRICH J (1997):

Is the expression of multidrug resistance gene product a prognostic indicator for the clinical outcome of patients with renal cancer?  
Br. J. Urol. 80, 11-17

HOLM-NIELSEN P, OLSEN TS (1988):

Ultrastructure of renal adenoma.  
Ultrastruct. Pathol. 12, 27-39

HOSOYAMADA M, SEKINE T, KANAI J, ENDOU H (1999):

Molecular cloning and functional expression of a multispecific organic anion transporter from human kidney.  
Am. J. Physiol. 276, F122-F128

JEDLITSCHKY G, LEIER I, BUCHHOLZ U, CENTER M, KEPPLER D (1994):

ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug-resistance associated protein.  
Cancer Res. 54, 4833-4836

JEDLITSCHKY G, LEIER I, BUCHHOLZ U, BARNOUIN K, KURZ G, KEPPLER D (1996):

Transport of glutathione, glucuronate and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump.  
Cancer Res. 56, 988-994

- KAHN AM, ARONSON P (1983):  
Urate transport via anion exchange in dog renal microvillus membrane vesicles.  
*Amer. J. Physiol.* 244, F56-F63
- KAHN AM, SHELAT H, WEINMAN EJ (1985):  
Urate and p-aminohippurate transport in rat renal basolateral vesicles.  
*Amer. J. Physiol.* 249, F654-F661
- KAJIJI S, DRESLIN JA, GRIZZUTI K, GROS P (1994):  
Structurally distinct modulators show specific patterns of reversal against P-glycoproteins bearing unique mutations at serine 939/941.  
*Biochemistry* 33, 5041-5048
- KAKEHI Y, KANAMARU H, YOSHIDA O, OHKUBO H, NAKANISHI S, GOTTESMAN MM, PASTAN I (1988):  
Measurement of multidrug resistance messenger RNA in urogenital cancers; elevated expression in renal cell carcinoma is associated with intrinsic drug resistance.  
*J. Urol.* 139, 862-865
- KALLIONIEMI O, KALLIONIEMI A, PIPER J, ISOLA J, WALDMAN F, GRAY J, PINKEL D (1994):  
Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors.  
*Genes Chromosom Cancer* 10, 231-243
- KANAI N, LU R, SATRIANO JA, BAO Y, WOLKOFF AW, SCHUSTER VL (1995):  
Identification and characterization of a prostaglandin transporter.  
*Science* 268, 866-869
- KANAMARU H, KAKEHI Y, YOSHIDA O, NAKANISHI S, PASTAN I, GOTTESMAN MM (1989):  
MDR1 RNA levels in human renal cell carcinomas: correlation with grade and prediction of reversal of doxorubicin resistance by quinidine in tumor explants.  
*J. Natl. Cancer Inst.* 81, 844-849
- KEPPLER D, KARTENBECK J (1996):  
The canalicular conjugate export pump encoded by the *cmrp/cmoat* gene.  
In: BOYER JL, OCKNER RK (Hrsg.): *Progress in Liver Diseases*. Vol 14.  
W.B. Saunders, Philadelphia, S. 55-67
- KEPPLER D, JEDLITSCHKY G, LEIER I (1998a):  
Transport function and substrate specificity of multidrug resistance protein.  
*Methods Enzymol.* 292, 607-616
- KEPPLER D, KÖNIG J, SCHAUB T, LEIER I (1998b):  
Molecular basis of ATP-dependent transport of anionic conjugates in kidney and liver.  
*Nova Acta Leopoldina NF* 78, Nr. 306, 213-221

- KINNE RK (1991):  
Selectivity and direction: plasma membranes in renal transport.  
Amer. J. Physiol. 260, F153-F162
- KINSELLA JL, HOLOHAN PD, PESSAH NI, ROSS CR (1979):  
Transport of organic ions in renal cortical luminal and antiluminal membrane vesicles.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 209, 443-450
- KLEIN EA (1989):  
The multidrug resistance gene in renal cell carcinoma.  
Sem. Urol. 7, 207-214
- KLEIN LE, HISAO P, BARTOLOMEI M, LO CS (1984):  
Regulation of rat renal ( $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ )-adenosine triphosphatase activity by triiodothyronine and corticosteroids.  
Endocrinol. 115, 1038-1042
- KOVACS G (1993):  
Molecular differential pathology of renal tumours.  
Histopathology 22, 1-8
- KOVACS G, WELTER C, WILKINS L (1989):  
Renal oncocytoma. A phenotypic and genotypic entity of renal parenchymal tumors.  
Amer. J. Pathol. 134, 967-971
- KRETZSCHMAR M (1996):  
Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity.  
Exp. Toxicol. Pathol. 48, 439-446
- KRETZSCHMAR M, FRANKE H, ZIMMERMANN T, DARGEL R, KLINGER W (1989):  
Glutathione syntheses and export in experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide: Relations to ultrastructural changes.  
Exp. Pathol. 36, 113-122
- KRIZ W, KAISSLING B (1992):  
Structural organization of the mammalian kidney.  
In: SELDIN DW, GIEBISCH G (Hrsg.): The kidney. Physiology and Pathophysiology. 3.Aufl., Bd.1, Raven Press, New York, S. 707-778
- LANG F, WALDEGGER S, MURER H, FOSTER I, KOEPEL H, PALACÌN M, BRÖER S, CAPASSO G, MATSKEVITCH J, WAGNER C, BUSCH AE (1998):  
Electrophysiology of proximal renal transporters.  
Nova Acta Leopoldina NF 78, Nr. 306, 73-78

- LEAL-PINTO E, TAO W, RAPPAPORT J, RICHARDSON M, KNORR BA, ABRAMSON RG (1997):  
Molecular cloning and functional reconstitution of a urate transporter/channel.  
J. Biol. Chem. 272, 617-625
- LEIER I, JEDLITSCHKY G, BUCHHOLZ U, CENTER M, KEPPLER D (1994):  
The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leucotriene C<sub>4</sub> and structurally related conjugates.  
J. Biol. Chem. 269, 27807-27810
- LEIER I, HUMMEL- EISENBEISS J, CUI Y, KEPPLER D (2000):  
ATP-dependent *para*-aminohippurate transport by apical multidrug resistance protein MRP2.  
Kidney Int. 57, 1636-1642
- LICHT T, GOTTESMAN MM, PASTAN I (1995):  
Transfer of the MDR 1 (multidrug resistance) gene: Protection of hematopoietic cells from cytotoxic chemotherapy, and selection of transduced cells in vivo.  
Cytokin. Mol. Ther. 1, 11-20
- LIPSKY MM jr, TRUMP BF (1988):  
Chemically induced renal epithelial neoplasia in experimental animals.  
Rev. Exp. Pathol. 30, 357-383
- LOE DW, ALMQUIST KC, DEELEY RG, COLE SPC (1996):  
Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leucotriene C<sub>4</sub> and chemotherapeutic agents in membrane vesicles: Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport.  
J. Biol. Chem. 271, 9675-9682
- LU R, CHAN BS, SCHUSTER VL (1999):  
Cloning of the human kidney transporter: Narrow substrate specificity and regulation by protein kinase C.  
Amer. J. Physiol. 276, F295-F303
- MACRI P, BRETON S, MARSOLAIS M, LAPOINTE J, LAPRADE R (1997):  
Hypertonicity decreases basolateral K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> conductances in rabbit proximal convoluted tubule.  
J. Membr. Biol. 155, 229-237
- MASEREEUW R, MOONS MM, TOOMEY BH, RUSSEL FGM, MILLER DS (1999):  
Active lucifer yellow secretion in renal proximal tubule: Evidence for organic anion transport system crossover.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 289, 1104-1111
- MASUDA S, SAITO H, NONOGUCHI H, TOMITA K, INUI K (1997):  
mRNA distribution and membrane localization of the OAT-K1 organic anion transporter in rat renal tubules.  
FEBS Letters 407, 127-131

- MAYER D, BANNASCH P (1988):  
Activity of glycogen synthase and phosphorylase and glucose-6-phosphate content in renal clear cell carcinomas.  
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 114, 369-372
- MAYER D, WEBER E, KADENBACH B, BANNASCH P (1989):  
Immunocytochemical demonstration of cytochrome C oxidase as a marker for renal oncocytes and oncocytomas.  
Toxicol. Pathol. 17, 46-49
- Mc KINNEY TD (1982):  
Heterogeneity of organic base secretion by proximal tubules.  
Amer. J. Physiol. 243, F404-F407
- MELNICK RL, KOHN MC, PORTIER CJ (1996):  
Implications for risk assessment of suggested nongenotoxic mechanisms of chemical carcinogenesis.  
Environ. Health Perspect. 104, 123-134
- MICKISCH GH (1992):  
Gentherapeutische Strategien für die Onkologie – Ein urologischer Standpunkt.  
Akt. Urol. 23, 206-215
- MICKISCH GH (1993):  
Immunologische Ansätze zur Überwindung von Chemoresistenz.  
Akt. Urol. 24, 87-94
- MICKISCH GH (1994a):  
New trends in the treatment of renal cancer.  
Akt. Urol. 25, 77-83
- MICKISCH GH (1994b):  
Multidrug resistance of renal cell carcinoma: From laboratory curiosity to clinical reality.  
Akt. Urol. 25, 327-337
- MICKISCH GH (1994c):  
Chemoresistance of renal cell carcinoma: 1986-1994.  
World J. Urol. 12, 214-223
- MICKISCH GH (1995):  
Gene therapy on renal-cell carcinoma: magic bullet or tragic insanity?  
World J. Urol. 13, 178-185
- MICKISCH GH, SCHRÖDER FH (1996):  
Multidrug resistance in renal cell carcinoma: Eight years of experience.  
In: LUCIANI L, DEBRUYNE FMJ, SCHALKEN JA (Hrsg.): Basic research in urological oncology.  
Karger, S. 161-177

- MICKISCH GH, KÖSSIG J, KEILHAUER G, SCHLICK E, TSCHADA R, ALKEN P (1990):  
Effects of calcium antagonists in multidrug resistant primary human renal cell carcinomas.  
Cancer Res. 50, 3670-3674
- MICKISCH GH, ALKEN P, GOTTESMAN MM, PASTAN I (1991a):  
Neue Verapamil-Derivate überwinden die multidrug resistance im Nierenzellkarzinom und in transgenen Mäusen, die das menschliche MDR1-Gen exprimieren.  
Akt. Urol. 22, 125-131
- MICKISCH GH, MERLINO GT, AIKEN PM, GOTTESMANN MM, PASTAN I (1991b):  
New potent verapamil derivatives that reverse multidrug resistance in human renal carcinoma cells and in transgenic mice expressing the human MDR1 gene.  
J. Urol. 146, 447-453
- MICKISCH GH, PASTAN I, GOTTESMAN MM (1991c):  
Multidrug resistance transgenic mice as a novel pharmacologic tool.  
Biol. Essays 13, 381-387
- MICKISCH GH, PAI LH, GOTTESMAN MM, PASTAN I, (1992):  
Monoclonal antibody MRK 16 reverses multidrug resistance in MDR-transgenic mice.  
Cancer Res. 52, 4427-4432
- MICKISCH GH, PAI LH, SIEGSMUND M, CAMPAIN J, GOTTESMAN MM, PASTAN I, (1993):  
Pseudomonas exotoxin conjugated to monoclonal antibody MRK16 specifically kills multidrug resistant cells in cultured renal carcinomas and in MDR-transgenic mice.  
J. Urol. 149, 174-178
- MILLER DS, LETCHER S, BARNES DM (1996):  
Fluorescence imaging study of organic anion transport from renal proximal tubule cell to lumen.  
Amer. J. Physiol. 271, F508-F520
- MIZUTANI Y, BONAVIDA B, NIO Y, YOSHIDA O (1994):  
Overcoming TNF- $\alpha$  and drug resistance of human renal cell carcinoma cells by treatment with Pentoxifylline in combination with TNF- $\alpha$  or drugs: The role of TNF- $\alpha$  mRNA downregulation in tumor cell sensitization.  
J. Urol. 151, 1697-1702
- MOSTOFI F (1981):  
Histological typing of kidney tumours. International classification of tumours. Geneva, WHO, No. 25

- MOTZER RJ, BANDER NH, NANUS DM (1996):  
Renal-cell carcinoma.  
N. Engl. J. Med. 335, 865-875
- NAITO S, SAKAMOTO N, KOTOH S, GOTO K, MATSUMOTO T, KUMAZAWA J (1993):  
Expression of P-glycoprotein and multidrug resistance in renal cell carcinoma.  
Eur. Urol. 24, 156-160
- NEUMANN F, SCHENCK B, SCHLEUSENER H, SCHWENKERT HU (1992):  
Endokrinopharmakologie.  
In: FORTH W, HENSCHLER D, RUMMEL W (Hrsg.): Pharmakologie und Toxikologie. 7.Aufl., BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich, S. 528-579
- NISHIYAMA K, SHIRAHAMA T, YOSHIMURA A, SUMIZAWA T, FURUKAWA T, ICHIKAWA- HARAGUCHI M, AKIYAMA S, OHI Y (1993):  
Expression of the multidrug transporter, P-glycoprotein, in renal and transitional cell carcinomas.  
Cancer (Phila.) 71, 3611-3619
- NOOTER K, HERWEIJER H (1991):  
Multidrug resistance (mdr) genes in human cancer.  
Br. J. Cancer 63, 663-669
- ORTMANN M, VIERBUCHEN M, KOLLER G, FISCHER R (1988):  
Renal oncocyoma. I. Cytochrome C oxidase in normal and neoplastic renal tissue as detected by immunohistochemistry – a valuable aid to distinguish oncocytomas from renal cell carcinomas.  
Virchows Arch. B (Cell Pathol.) 56, 165-173
- ORTWEILER W, JAHN F, BRÄUNLICH H (1987):  
Increase of <sup>14</sup>C-leucine uptake following stimulation of renal tubular transport processes.  
Biomed. Biochim. Acta 46, 271-276
- OUDE ELFERINK RPJ, PAULUSMA C, DE VREE M, FRIJTERS CMG, GROEN BK (1998):  
The role of ABC-transporters in hepatobiliary excretion.  
Nova Acta Leopoldina NF 78, Nr. 306, 157-163
- PARRISH AR, GANDOLFI AJ, BRENDDEL K (1995):  
Minireview: Precision cut tissue slice: Applications in pharmacology and toxicology.  
Life. Sci. 57, 1887-1901
- PASTAN I, FITZGERALD D (1991):  
Recombinant toxins for cancer treatment.  
Science 254, 1173-1177



PAULUSMA CC, BOSMA PJ, ZAMAN GJR, BAKKER CTM, OTTER M, SCHEFLER GL, SCHEPER RJ, BORST P (1996):

Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene.

Science 271, 1126-1128

PENG KC, CLUZEAUD F, BENS M, VAN HUYEN JP, WIOLAND MA,

LACAVE R, VANDEWALLE A (1999):

Tissue and cell distribution of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in mouse intestine and kidney.

J. Histochem. Cytochem. 47, 757-768

PIERRE A, DUNN TA, KRAUS-BERTHIER L, LEONCE S, SAINT-DIZIER D, REGNIER G, DHAINAUT A, BERLION M, BIZZARI JP, ATASSI G (1992):

In vitro and in vivo circumvention of multidrug resistance by Servier 9788, a novel triazinoaminopiperidine derivative.

Invest. New Drugs 10, 137-148

PORZOLT F, WÖLPL CP, RIST CE, BÜCHELE G, GAUS W (1996):

Vergleich von drei Instrumenten, die gesundheitsbezogene Lebensqualität/Qualität von Wohlbefinden messen.

In: BIERMANN CW (Hrsg): Derzeitiger Stand und Aspekte der Lebensqualitätsforschung in der urologischen Onkologie.

W. Zuckschwerdt Verlag München, S. 105-119

PRITCHARD JB (1987):

Luminal and peritubular steps in renal transport of p-aminohippurate.

Biochem. Biophys. Acta 906, 295-308

PRITCHARD JB (1988):

Coupled transport of p-aminohippurate by rat kidney basolateral membrane vesicles.

Amer. J. Physiol. 255, F597-F604

PRITCHARD JB, MILLER DS (1993):

Mechanisms mediating renal secretion of organic anions and cations.

Physiol. Rev. 73, 765-796

ROCH-RAMEL F, WERNER D, GUIBAN B (1994):

Urate transport in brush border membrane of human kidney.

Amer. J. Physiol. 266, F797-F805

ROCH-RAMEL F, GUIBAN B, SCHILD L (1996):

Indirect coupling of urate and p-aminohippurate transport to sodium in human brush-border membrane vesicles.

Amer. J. Physiol. 270, F61-F68

- ROCH-RAMEL F, GUISAN B, DIEZI J (1997):  
Effect of uricosuric and antiuricosuric agents on urate transport in human brush border membrane vesicles.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 280, 839-845
- ROCHLITZ CF, LOBECK H, PETER S, REUTER J, MOHR B, DE KANT E, HUHND, HERRMANN R (1992):  
Multiple drug resistance gene: Expression in human renal cell cancer is associated with the histologic subtype.  
Cancer 69, 2993-2998
- ROSENBERG SA (1991):  
Immunotherapy and gene therapy of cancer.  
Cancer Res. 51(Suppl.), 5074-5079
- ROSENBERG SA, SPIESS P, LAFRENIERE R (1986):  
A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes.  
Science 233, 1218-1321
- RUMPELT HJ, STÖRKEL S, MOLL R, SCHÄRFE T, THOENES W (1991):  
Bellini duct carcinoma – further evidence for this rare variant of RCC.  
Histopathology 18, 115-122
- RUSSEL FG, VAN DER LINDEN PE, VERMEULEN WG, HEIJN M, VAN OS CH, VAN GINNEKEN CA (1988):  
Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> gradient-dependent transport of p-aminohippurate in membrane vesicles from dog kidney cortex.  
Biochem. Pharmacol. 37, 2639-49
- SAFRIT JT, BELLDEGRUN A, BONAVIDA B (1993):  
Sensitivity of human renal cell carcinoma lines to TNF, Adriamycin, and combination: Role of TNG mRNA induction in overcoming resistance.  
J. Urol. 149, 1202-1208
- SAITO H, MASUDA S, INUI KI (1996):  
Cloning and functional characterization of a novel rat organic anion transporter mediating basolateral uptake of methotrexate in the kidney.  
J. Biol. Chem. 271, 20719-20725
- SAMUELS BL, HOLLIS DR, ROSNER GL, TRUMP DL, SHAPIRO CL, VOGELZANG NJ, SCHILSKY RL (1997):  
Modulation of vinblastine resistance in metastatic renal cell carcinoma with cyclosporine A or tamoxifen: a cancer and leukemia group B study.  
Clin. Cancer Res. 3, 1977-1984

SCHAUB TP, KARTENBECK J, KÖNIG J, VOGEL O, WITZGALL R, KRITZ W, KEPPLER D (1997):

Expression of the conjugate export pump encoded by the *mrp-2* gene in the apical membrane of kidney proximal tubules.  
J. Amer. Soc. Nephrol. 8, 1213-1221

SCHAUB TP, KARTENBECK J, KÖNIG J, SPRING H, DÖRSAM J, STAEHLER G, STÖRKEL S, THON WF, KEPPLER D (1999):

Expression of the *MRP2* gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma.  
J. Amer. Soc. Nephrol. 10, 1159-1169

SCHELTEMA JMW, SCHROEDER FH, MICKISCH GH (1994):

Alterations in topoisomerase II contribute to multidrug resistance of human renal carcinoma cells.  
J. Urol. 151, 386-386

SCHINKEL AH, WAGENAAR E, VAN DEEMTER L, MOL CA, BORST P (1995):

Absence of the *mdr1a* P-glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin and cyclosporin A.  
J. Clin. Invest. 96, 1698-1705

SCHMIDT M (1995):

Renale Ausscheidung und tubulärer Transport von p-Aminohippursäure bei Ratten unterschiedlichen Alters nach kombinierter Vorbehandlung mit Calcitriol und Schilddrüsenhormonen.  
Dissertation, Medizinische Fakultät der FSU Jena

SCHMITT C, BURCKHARDT G (1993):

p-Aminohippurate/ 2-oxoglutarate exchange in bovine renal brush border and basolateral membrane vesicles.  
Pflügers Arch. 423, 280-290

SCHRÖDER J (1995):

Morphologische und klinische Charakteristika operierter Nierenzellkarzinome.  
Inaugural-Dissertation, Freie Universität Berlin

SCHULDES H (1992):

Zytostatika in der Onkologie.  
NBP 4, 73-76

SEKINE T, WATANABE N, HOSoyAMADA M, KANAI J, ENDOU H (1997):

Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter.  
J. Biol. Chem. 272, 18526-18529

SHIMADA H, MOEWES B, BURCKHARDT G (1987):

Indirect coupling to  $\text{Na}^+$  of p-aminohippurate acid uptake into rat renal basolateral membrane vesicles.  
Amer. J. Physiol. 253, F795-F801

- SPLINTER FK, BRÄUNLICH H (1973):  
Binding of p-aminohippuric acids, hydrochlorothiazide and cyclopenthiazide serum proteins in rats of various ages.  
Acta Biol. Med. Ger. 31, 621-625
- STOPP M (1982):  
Postnatale Entwicklung und Stimulation des renalen tubulären Transportes von p-Aminohippursäure.  
Promotion B, Medizinische Fakultät der FSU Jena
- STOPP M, BRÄUNLICH H (1974):  
Optimal, age dependent incubation conditions for accumulation of p-aminohippuric acid (PAH) in kidney cortex sections of Wistar rats (Uje: Wist) of various ages.  
Z. Versuchstierkd. 16, 131-141
- STOPP M, BRÄUNLICH H (1975):  
Die Akkumulation von p-Aminohippursäure und Zyclopenthiazid in Nierenrindenschnitten verschieden alter Ratten und ihre Abhängigkeit von der Energiebereitstellung.  
Acta Biol. Med. Germ. 34, 89-98
- STOPP M, BRÄUNLICH H (1980):  
*In vitro* analysis of drug-induced stimulation of renal tubular p-aminohippurate (PAH) transport in rats.  
Biochem. Pharmacol. 29, 983-986
- STÖRKEL S, STEART PV, DRENCKHAHN D, THOENES W (1988):  
The human chromophobe cell renal carcinoma – its probable relation to intercalated cells of the collecting duct.  
Virchows Arch. B (Cell Pathol.) 56, 237-245
- STÖRKEL S, EBLE JN, ADLAKHA K, AMIN M, BLUTE ML, BOSTWICK DG, DARSON M, DELAHUNT B, ICZKOWSKI K (1997):  
Classification of renal cell carcinoma: Workgroup no 1.  
Cancer 80, 987-989
- SWEET DH, WOLFF NA, PRITCHARD JB (1997):  
Expression cloning and characterization of ROAT1: The basolateral anionic transporter in rat kidney.  
J. Biol. Chem. 272, 30088-30095
- TANDON AK, HILSENBECK SG, CLARK GM, ALLRED DC, LATHAN MD, ROOS W, Mc GUIRE WL (1991):  
Significance of topoisomerase II in clinical breast cancer.  
Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 32, 350-350

- TANNER DC, LIPSKY MM (1984):  
Effect of lead acetate on N'-(4'-fluoro-4-biphenyl)acetamide induced renal carcinogenesis in the rat.  
Carcinogenesis 5, 1109-1113
- TCHAO R, EASTY GC, AMBROSE EJ, RAVEN RW, BLOOM HJG (1968):  
Effect of chemotherapeutic agents and hormones on organ cultures of human tumours.  
Eur. J. Cancer 4, 39-44
- THEWS G, MUTSCHLER E, VAUPEL P (1999):  
Anatomie und Pathophysiologie des Menschen. 5.Aufl.  
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, S. 407-442
- THIEBAUT F, TSURUO T, HAMADA H, GOTTESMANN MM, PASTAN M, WILLINGHAM MC (1987):  
Cellular localization of the multidrug-resistance gene product p-glycoprotein in normal human tissues.  
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 84, 7735-7738
- THOENES W, STÖRKEL S, RUMPELT H-J (1986):  
Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas): the basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics.  
Pathol. Res. Pract. 181, 125-143
- THOENES W, STÖRKEL S, RUMPELT H-J, MOLL R, BAUM HP, WERNER S (1988):  
Chromophobe cell renal carcinoma and its variants – a report on 32 cases.  
J. Pathol. 155, 277-287
- THOENES W, RUMPELT H-J, STÖRKEL S (1990):  
Klassifikation der Nierenzellkarzinome und -tumoren und ihre Beziehung zum Nephron-Sammelrohrsystem.  
Klin. Wochenschr. 68, 1102-1111
- TOBE SW, NOBLE-TOPHAM SE, ANDRULIS IL, HARTWICK RWJ, SKORECKI KL, WARNER E (1995):  
Expression of the multiple drug resistance gene in human renal cell carcinoma depends on tumor histology, grade, and stage.  
Clin. Cancer Res. 1, 1611-1615
- TORRES VE, BJORNSSON J, ZINCKE H (1998):  
Inherited renal neoplasms.  
J. Nephrol. 11, 229-238
- TSUDA H, HACKER HJ, KATAYAMA H (1986):  
Correlative histochemical studies in preneoplastic and neoplastic lesions in the kidney of rats treated with nitrosamines.  
Virchows Arch. B 51, 385-404

- ULLRICH KJ (1994):  
Specificity of transporters for „organic anions“ and „organic cations“ in the kidney.  
Biochem. Biophys. Acta 1197, 45-62
- ULLRICH KJ (1997):  
Renal transporters for organic anions and organic cations: Structural requirements for substrates.  
J. Membr. Biol. 158, 95-107
- ULLRICH KJ (1998):  
Features of substrates for interaction with renal transporters of organic anions and cations.  
Nova Acta Leopoldina NF 78, Nr. 306, 23-34
- ULLRICH KJ (1999):  
Affinity of drugs to the different renal transporters for organic anions and  $\alpha$ -organic cations. In situ  $K_i$  values.  
In: AMIDON GL, SADEE W (Hrsg.): Membrane transporters as drug targets.  
Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, S. 159-179
- ULLRICH KJ, RUMRICH G, PAPA VASSILIOU F, HIERHOLZER K (1991):  
Contraluminal p-aminohippurate transport in the proximal tubule of the rat kidney.  
Pflügers Arch. 418, 371-382
- ULLRICH KJ, RUMRICH G, NEITELER K, FRITZSCH G (1992):  
Contraluminal transport of organic cations in the proximal tubule of the rat kidney. II. Specificity: anilines, phenylalkylamines (catecholamines), hetero-cyclic compounds (pyridines, quinolines, acridines).  
Pflügers Arch. 420, 29-38
- VAN BRUSSELS JP, MICKISCH GH (1998):  
Circumvention of multidrug resistance in genitourinary tumors.  
Int. J. Urol. 5, 1-15
- VAN GINNEKEN CA, RUSSEL FG (1989):  
Saturable pharmacokinetics in the renal excretion of drugs.  
Clin. Pharmacokinet. 16, 38-54
- VAN HELVOORT A, SMITH AJ, SPRONG H, FRITZSCHE I, SCHINKEL AH, BORST P, VAAN MEER G (1996):  
P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine.  
Cell 87, 507-517

VAN KALKEN CK, VALK P VAN DER, HADISAPUTRO MMN, PIETERS R, BROXTERMANN HJ, KUIPER CM, SCHEFER GL, VEERMAN AJP, MEIJER CJLM, SCHEPER RJ, PINEDO HM (1991):

Differentiation dependent expression of P-glycoprotein in the normal and neoplastic human kidney.

Ann. Oncol. 2, 55-62

VILLALOBOS AR, DUNNICK CA, PITCHARD JB (1996):

Mechanism mediating basolateral transport of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in rat kidney.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 278, 582-589

VOLM M, POMMERENKE EW, EFFERTH T, LÖHRKE H, MATTERN J, (1991):

Circumvention of multidrug resistance in human kidney and kidney carcinoma.

Cancer 67, 2484-2489

VOLM M, MATTERN J, EFFERTH T, POMMERENKE EW (1992):

Expression of several resistance mechanisms in untreated human kidney and lung carcinomas.

Anticancer Res. 12, 1063-1068

VOLM M, KÄSTEL M, MATTERN J, EFFERTH T (1993):

Expression of resistance factors (P-glycoprotein, glutathione S-transferase-p, and topoisomerase II) and their interrelationship to proto-oncogene products in renal cell carcinomas.

Cancer 71, 3981-3987

WAALKES MP (2000):

Cadmium carcinogenesis in review.

J. Inorg. Biochem. 79, 241-244

WEDEEN RP, WEINER B (1973):

The distribution of p-aminohippuric acid in rat kidney slices. II. Depth of uptake.

Kidney Int. 3, 214-221

WEINMANN EJ, SANSOM SC, BENNETT S, KAHN AM (1983):

Effect of anion exchange inhibitors and para-aminohippurate on the transport of urate in the rat proximal tubule.

Kidney Int. 23, 832-837

WOLFF NA, WERNER A, BURCKHARDT S, BURCKHARDT G (1997):

Expression cloning and characterization of a renal organic anion transporter from winter flounder.

FEBS Lett. 417, 287-291

YAMAMOTO K (1985):

Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks.

Ann. Rev. Genet. 19, 209-252

- YU DS, SUN GH, MA CP, CHANG SY (1999):  
Coctail modulator mixtures for overcoming multidrug resistance in renal cell carcinoma.  
Urology 54, 377-381
- ZOLLINGER HU, MIHATSCH MJ (1978):  
Renal Pathology in Biopsy.  
Springer Berlin, S. 554-562



# Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erklären wir, dass uns die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

wir die Dissertation selbst angefertigt haben und alle von uns benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in unserer Arbeit angegeben sind,

uns folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. Christian Fleck  
MTA Frau Hannelore Prager  
MTA Frau Annegret Berthold,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und das Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von uns für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass wir die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht haben und

dass wir die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht haben.

Folgende Abschnitte entstanden in Verantwortung von:

- |       |                         |                |
|-------|-------------------------|----------------|
| 1.    | Einleitung:             | Birgit Bachner |
| 2.    | Material und Methoden:  | Ute Strohm     |
| 3.1   | Ergebnisse Tierversuch: | Birgit Bachner |
| 3.2   | Ergebnisse Mensch:      | Ute Strohm     |
| 4.1/2 | Diskussion Tierversuch: | Birgit Bachner |
| 4.3/4 | Diskussion Mensch:      | Ute Strohm     |

Die nicht erwähnten Abschnitte wurden von beiden Autoren gemeinsam erarbeitet.

Jena, den 13.03.2002

Birgit Bachner

Ute Strohm

# Danksagung

Unser besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ch. Fleck für die fachliche Anleitung bei der Durchführung der Versuche sowie für die intensive Betreuung und zahlreichen Anregungen beim Schreiben der vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof. Dr. J. Schubert, Direktor der Klinik für Urologie des Klinikum der FSU Jena, danken wir für die Bereitstellung des menschlichen Nierengewebes und die gute Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern der Urologischen Klinik.

Frau Prager und Frau Berthold danken wir für die wertvolle Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Nicht zuletzt möchten wir auch unseren Familien und Freunden für ihr Verständnis und ihre Nachsicht danken, wenn wir ihnen Zeit und Zuwendung entzogen haben, die statt ihnen der Anfertigung dieser Arbeit zugekommen ist.

Jena, August 2001

Birgit Bachner

Ute Stroh

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

**Name :** Bachner  
**Vorname :** Birgit **Staatsbürgerschaft:** Deutsch  
**Geburtsdatum:** 09.06.1971 **Geburtsort:** Köthen  
**Privatanschrift:** Bahnhofstr. 2a, 06791 Möhlau

## Schulbildung

**Abitur:** EOS „Johann Wolfgang von Goethe“, Köthen, 1990

## Hochschulstudium

1991-1996 Studium der Zahnmedizin an der Friedrich Schiller Universität Jena  
20.01.1997 Approbation als Zahnärztin

## Weitere Ausbildung

1997-1999 Ausbildungs- und Entlastungsassistentin in Zahnarztpraxis Dr. Ilgner in Raguhn  
1999 Praktikum in der Kieferchirurgischen Gemeinschaftspraxis Dr. Hundeshagen / Dr. Bauer in Dessau

## Tätigkeit

Seit Juli 1999 Zahnärztin in Gemeinschaftspraxis Dr. Pfaffe/Bachner in Pretzsch/Elbe

**Betreuender Hochschullehrer:** Prof. Dr. Ch. Fleck  
**Institut/ Klinik:** Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FSU Jena

**Seit wann wurde das Promotionsthema bearbeitet:** 11/1995

**Eingeschrieben als Promotionsstudent der FSU Jena seit:** 14.11.2000

**Matrikelnummer:** 7601

Jena, August 2001

Birgit Bachner

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

**Name:** Strohm, geb. Frischmann  
**Vorname:** Ute **Staatsbürgerschaft:** Deutsch  
**Geburtsdatum:** 15.12.1971 **Geburtsort:** Karl-Marx-Stadt  
**Privatanschrift:** Blumenweg 14, 09224 Gröna

## Schulbildung

**Abitur:** EOS „Karl Marx“, Chemnitz, 1990

## Hochschulstudium

1991-1996 Studium der Zahnmedizin an der Friedrich Schiller Universität Jena  
20.01.1997 Approbation als Zahnärztin

## Weitere Ausbildung

1997-1999 Ausbildungsassistentin in Zahnarztpraxis Dr. Jolie in Eppendorf  
1997-1998 Ausbildungsassistentin in der Kieferchirurgischen Gemeinschaftspraxis  
Dr. Berger / Dr. Glase in Chemnitz  
1999-2000 Entlastungsassistentin in Zahnarztpraxis SR Schneider in Limbach-  
Oberfrohna

## Tätigkeit

2001 Zahnärztin in eigener Niederlassung in Limbach-Oberfrohna

**Betreuender Hochschullehrer:** Prof. Dr. Ch. Fleck  
**Institut/ Klinik:** Institut für Pharmakologie und Toxikologie der  
FSU Jena

**Seit wann wurde das Promotionsthema bearbeitet:** 11/1995

**Eingeschrieben als Promotionsstudent der FSU Jena seit:** 14.11.2000

**Matrikelnummer:** 2861

Jena, August 2001

Ute Strohm

# **Thesen**

**zur Dissertation:**

## **„*In vitro*-Stimulierbarkeit der Akkumulation von PAH in gesundem Nierengewebe von Ratte und Mensch und in menschlichem Nierenzellkarzinomgewebe.“**

vorgelegt von

**Birgit Bachner**

geb. am 09.06.1971 in Köthen

und

**Ute Strohm**

geb. am 15.12.1971 in Karl-Marx-Stadt

1. In vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich die Akkumulationsfähigkeit für p-Aminohippursäure (PAH) in intaktem Nierengewebe von Ratte und Mensch nach *in vitro*-Vorbehandlung mit Dexamethason, nicht aber mit T<sub>3</sub>, stimulieren lässt.
2. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob auch in menschlichen Nierenzellkarzinomen (NZK) die Akkumulationskapazität gesteigert werden kann. Gelänge dies, wäre damit eventuell eine neue Möglichkeit gegeben, die Fremdstoffkonzentration, z. B. die von Zytostatika, in der Tumorzelle zu erhöhen und damit vor allem die Abheilung der Metastasen eines NZK zu begünstigen, die für ihre hochgradige multidrug resistance (MDR) bekannt sind.
3. Zur Optimierung des Versuchsansatzes wurden Voruntersuchungen an Nierengewebe der Ratte durchgeführt. Menschliches Nierengewebe (n = 32 Patienten) wurde im Rahmen einer Tumornephrektomie in der Klinik für Urologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena gewonnen (Direktor: Prof. Dr. med. J. Schubert).

4. In den sog. Akutversuchen (2 Stunden, O<sub>2</sub>-Begasung, Cross-Taggart-Medium) wurde die PAH-Akkumulationsfähigkeit von frisch entnommenem Nierengewebe bestimmt. Als Maß der PAH-Aufnahme diente der Schnitt-Medium-Quotient ( $Q_{S/M}$ ), der die Relation der PAH-Konzentrationen im Gewebe zu der im Inkubationsmedium wiedergibt.
5. Der Schwerpunkt der Arbeit lag auf den sog. Langzeitversuchen, in denen die Nierenrindenschnitte in Williams E-Medium, das Dexamethason bzw. T<sub>3</sub> enthielt, unter Carbogenbegasung 24 Stunden inkubiert wurden. Anschließend wurde, analog zu den Akutversuchen, die PAH-Akkumulation bestimmt. Die Funktionsfähigkeit der Nierenrindenschnitte nach 24-stündiger Inkubation ließ sich durch Messung der intrazellulären Konzentrationen an Kalium und Glutathion (GSH, GSSG) verifizieren.
6. Für die Ratten konnten Ergebnisse früherer Untersuchungen bestätigt werden: nach 24-stündiger Inkubation mit Dexamethason kommt es zu einer signifikanten Zunahme der PAH-Akkumulationsfähigkeit (133%). Dagegen führt die Langzeitinkubation mit T<sub>3</sub> zu einer signifikanten Abnahme der PAH-Aufnahme in das Nierengewebe.
7. In intaktem menschlichen Nierengewebe wird PAH weniger effektiv als bei der Ratte angereichert (niedrigere  $Q_{S/M}$ ). NZK-Gewebe ist überhaupt nicht in der Lage, PAH aktiv zu akkumulieren ( $Q_{S/M} < 1$ ). Als Gründe hierfür kommen in Betracht, dass das NZK aufgrund seiner Abstammung von Zellen des Sammelrohres (20 %) PAH a priori nicht akkumulieren kann bzw. wegen des Vorhandenseins einer Vielzahl sog. multidrug-resistance-Proteine im NZK ein beschleunigter Austransport des aufgenommenen PAH stattfindet.
8. Sowohl in intaktem Nierengewebe als auch im NZK-Gewebe des Menschen kann die PAH-Akkumulationskapazität nach einer 24-stündigen Inkubation mit Dexamethason signifikant gesteigert werden. Glukokortikoide haben somit einen stimulierenden Effekt auf die PAH-Akkumulationsfähigkeit, speziell in der maligne entarteten Nierenzellen. Hier hat Dexamethason sogar eine höhere Wirksamkeit bezüglich der PAH-Aufnahme als in intaktem menschlichem Nierengewebe (1,9- vs. 1,5-fache Zunahme der PAH-Akkumulation).

9. Überraschender Weise reagiert das NZK-Gewebe der einzelnen Patienten unterschiedlicher auf Dexamethason: bei einigen Patienten (6/13) ließ sich die PAH-Aufnahme durch Dexamethason deutlich stimulieren („Responder“). Bei den übrigen Patienten (7/13, „Non Responder“), war keine Stimulation des PAH-Transportes im NZK nachweisbar. Die Unterteilung in „Responder“ und „Non Responder“ könnte mit der Anzahl an Glukokortikoidrezeptoren in Zusammenhang stehen, da in der Literatur beschrieben wurde, dass nicht alle NZK Glukokortikoidrezeptoren besitzen.
10. Ein Zusammenhang zwischen Dexamethasonwirkung und Tumorstadium konnte aufgrund der relativ geringen Patientenzahl nicht hergestellt werden. Prinzipiell wird die Möglichkeit eines derartigen Zusammenhanges allerdings im Schrifttum diskutiert, zumindest existiert eine inverse Korrelation zwischen der Konzentration an P-Glycoprotein im NZK und seinem histopathologischen Differenzierungsgrad.
11. Eine aktive PAH-Aufnahme in die Tubuluszelle ist erwartungsgemäß nur bei ausreichender Energiebereitstellung möglich. Inkubationsversuche unter anaeroben Bedingungen ( $N_2$ -Begasung) zeigten, dass in allen Geweben und unter allen Versuchsbedingungen die  $Q_{S/M}$ -Werte bei ca. 1 lagen.
12. Im Gegensatz zu Dexamethason übt  $T_3$ , wie auch bei der Ratte, keinen stimulierenden Einfluss auf die PAH-Anreicherung aus, weder in intaktem Nierengewebe noch in NZK-Gewebe des Menschen.  $T_3$  steigert möglicherweise das sogenannte „house-keeping“ der Tubuluszellen, d.h. die Aufnahme energiereicher Substrate an der basolateralen Membran, wodurch die intrazellulären Energiereserven aufgebraucht würden und somit nicht genügend ATP für den PAH-Transport zur Verfügung stünde.
13. Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass zwar durch Dexamethason-Vorbehandlung *in vitro* prinzipiell eine Zunahme der Fremdstoffaufnahme im NZK-Gewebe möglich ist. Ob mit dieser Therapiestrategie auch die Anreicherung von Zytostatika *in vivo* gesteigert werden kann bzw. inwieweit Dexamethason in pharmakologischer Dosierung auch den Austransport von Zytostatika aus der Tumorzelle stimuliert, muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.